

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSGRADO

**Efectos del extracto acuoso de las hojas *de Piper
angustifolium* R & P (matico) sobre la ulcera gástrica
inducida en animales de experimentación**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Farmacia y
Bioquímica

AUTOR

Jorge Luis ARROYO ACEVEDO

ASESOR

Bertha PAREJA PAREJA

Lima – Perú

1998

AGRADECIMIENTOS

Dra. Bertha PAREJA PAREJA

Por su invalorable apoyo en la dirección de la ejecución de la investigación.

Dr. José RAEZ GONZALEZ

Médico Anatómo Patólogo del Instituto de Patología de la Facultad de Medicina de la UNMSM, por su asesoramiento en los estudios anatomohistológicos

Sr. José Ricardo CASTILLO CRISOLOGO

Técnico del Ins. Patología, Facultad Medicina- UNMSM, por su apoyo técnico para los estudios anatomohistológicos

Dr. Carlos ARAUJO GARAY

Médico Gastroenterólogo, del Hospital Arzobispo Loayza, por su asesoría brindada en la realización del estudio clínico.

Mg. Pablo Enrique BONILLA RIVERA

Instituto Química Orgánica Aplicada a la Farmacia, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, por su asesoría en los estudios fitoquímicos.

LABORATORIO INDUQUIMICA

Por su apoyo, en la formulación de las cápsulas del micronizado de matico

A mi esposa María Soledad SANDOVAL MANTILLA, mis hijos Jorge Alejandro, María Sofía y María Soledad, por haber soportado, con entereza, las consecuencias de un proceso investigador que conlleva entrega y sacrificios

A SOFIA

Quien supo guiarme desde los primeros días de mi vida, por su permanente estímulo en la brega.

MIEMBROS DEL JURADO INFORMANTE

Dra. Luz OYOLA DE BARDALES	<i>Presidenta</i>
Dra. Bertha PAREJA PAREJA	Miembro-Asesora
Dr. Manuel PALOMINO YAMAMOTO	Miembro

MIEMBROS DEL JURADO EXAMINADOR

Dra. Nancy LOZANO REYES	<i>Presidenta</i>
Dra. Luz OYOLA DE BARDALES	Miembro
Dra. Bertha PAREJA PAREJA	Miembro-Asesora
Dr. Manuel PALOMINO YAMAMOTO	Miembro
Dr. Fernando MONTESINOS AMPUERO	Miembro

SUMARIO

SUMMARY

RIASSUNTO

RESUMEN

- I. INTRODUCCION
- II. GENERALIDADES
- III. MATERIAL Y METODOS
- IV. RESULTADOS
- V. DISCUSION
- VI. CONCLUSIONES
- VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

SUMMARY

The purpose of the present investigation has been to prove the healing and antiinflammatory effects as well as the possible toxicity of the water and alcoholic extracts and the micronized powder of the leaves of *Piper angustifolium* R & P. We identified the active molecules responsible of the pharmacological action which were identified as the secondary metabolites present in the administered fraction of the extract wich contained flavonones, flavones or isoflavones. We also observed a better healing effect with the use the alcoholic extract externally applied in experimental wounds in the loin of mice than by the per-oral route. Cytoprotector effect upon stress and indomethacin induced ulcers on gastric mucous of rats and mice was more evident, as it was the antisecretory effect by diminishing volume and number hydrogen ions miliequivalents/liter of secretion, assessed by ligated pylorus procedure in rats. Acute toxicity in mice by peroral route demonstrated a letal dosis 50 over 15 000 mg/kg for aqueous and micronized extracts and 2 366,2 mg/kg for alcoholic extract. The subacute dosis en rats (3 months) of aqueous extract at 15 and 45 mg/kg by peroral route; no organic morphologic changes were identified by histopatology; however there was a rise in serum globulins, reduction in cholesterol. Twelve out patients were clinically followed also, showing a trend toward reduction of scores, according to Liker scale used before and after, of eight characteristic symtoms of peptic ulcer; as: dyspepsia, epygastric pain, rythmic pain, early fulness, nausea, pyrosis, periodicity and sialorrhea.

KEY WORDS: *Piper angustifolium*, matico, gastric ulcer

RIASSUNTO

Lo scopo di questa ricerca fu di accertare gli effetti cicatrizzanti e antinfiammatorio, così come i possibili effetti tossici degli estratti acquosi, alcolico e polvere micronizzata delle foglie di *Piper angustifolium* R & P. I principi responsabili della attività farmacologica vennero identificati, i quali si determinano come metaboliti secondari presenti in una frazione del consumo somministrato, acquistandosi una frazione farmacologicamente più efficace, per contenere flavone, flavanone e isoflavone. In esperimento venne osservato un miglior effetto cicatrizzante con la somministrazione dello strato alcolico tanto via topica quanto via perorale in lesioni indotte sulla schiena d'un topolino. L'effetto citoprotettore sulle ulcere prodotte dallo stress e indometacina nella mucosa gastrica di topi e topolini fu più evidente, così come l'effetto antisecretorio nel diminuire il volume e numero di mEq/litro di ioni idrogeno della secrezione gastrica, valutati dal procedimento di piloro legato in topi. La tossicità acuta in topolini via perorale dimostrò una dose mortale 50 su 15 000 mg/kg per lo strato acquoso e il micronizzato, di 2362,2 mg/kg per l'alcolico. La sottocutanea in topi (3 mesi) dello strato acquoso, a 15 e 45 mg/kg per via perorale, istopatologicamente non mise evidenza cambiamenti morfologici organici, comunque ci fu un incremento o crescita di globuline sieriche, diminuzione di colesterolo. Anche venne fatto il seguimiento clinico in 12 malati ambulatori, e venne osservata una inclinazione dalla diminuzione del punteggio nella scala di Likert messa in uso prima e dopo di otto sintomi caratteristici dell'ulcera peptica, tali: dispepsia, dolore epigastrico, dolore ritmato, pienezza precoce, nausea, pirosi, periodicità e sialorrea.

PAROLE CHIAVI: *Piper angustifolium*, matico, ulcera gastrica

RESUMEN

La finalidad de la presente investigación fue comprobar los efectos cicatrizante y antiinflamatorio, así como los posibles efectos tóxicos de los extractos acuoso, alcohólico y polvo micronizado de las hojas de *Piper angustifolium* R. & P., se identificaron los principios activos responsables de la actividad farmacológica, los cuales se determinaron como metabolitos secundarios presentes en una fracción del extracto administrado, obteniéndose una fracción farmacológicamente más efectiva, por contener flavononas, flavonas o isoflavonas. Experimentalmente se observó mejor efecto cicatrizante con la administración del extracto alcohólico por vía tópica que por la peroral en lesiones inducidas en lomo del ratón. El efecto citoprotector sobre úlceras producidas por estrés e indometacina en la mucosa gástrica de ratas y ratones fue mas marcado, así como el efecto antisecretorio al disminuir el volumen y número de miliequivalentes/litro de iones hidrógeno de la secreción gástrica, evaluados por el procedimiento de piloro ligado en ratas. La toxicidad aguda en ratones por vía peroral, demostró una dosis letal 50 sobre 15,000 mg/kg, para el extracto acuoso y el micronizado; y 2366,2 mg/kg para el alcohólico. La subcrónica en ratas (3 meses), del extracto acuoso, a 15 y 45 mg/kg, por vía peroral; histopatológicamente no evidenció cambios morfológicos orgánicos; sin embargo hubo aumento de globulinas séricas; disminución de colesterol. También se hizo el seguimiento clínico a 12 paciente ambulatorios, observándose una tendencia a la disminución de los puntajes según la escala de Liker utilizada antes y después, de ocho síntomas característicos de la úlcera péptica; como son: dispepsia, dolor epigástrico, dolores rítmicos, sensación de llenura, náuseas, pirosis, y sialorrea

PALABRAS CLAVES: *Piper angustifolium*, matico, úlcera gástrica

INTRODUCCION

Las hojas y ramas de *Piper angustifolium* R. & P. o *Piper aduncum*, o *Piper elongatum*, contienen aceites esenciales, ácido artánico, resinas, sustancias amargas (maticina), taninos, alcaloides, saponinas, flavonoides triterpenoides (Palacios V., 1993). Los taninos y saponinas son responsables de la actividad antiulcerosa gástrica (LipKin M., 1971; Oliveira Souza F.M. y col 1991); los flavonoides tienen propiedades antioxidantes y protectoras de la mucosa gástrica (Aguwa C. at el 1994; Alarcon de la L. at el 1993; Beil W at el 1995); los estudios de Orjala y col., (1994) comprobaron la actividad antibacteriana de las dihidrochalconas que se hallan en el *Piper aduncum*. En la medicina popular se recomienda tomar la infusión de cinco hojas en una taza de agua tres veces al día para tratar las úlceras estomacales (Sánchez Z., y col 1995); los estudios han demostrado que el *Piper methysticum*, contiene kavapyrona la cual posee una acción sedante modulada a través del sistema GABAérgico (Jussofie A. at el 1994), el mismo que regularía la úlcera emotiva. Lemos y col.(1990), exponen que dentro de los usos etnomédicos en Brasil, se usa para dolores de muelas, en malestares gástricos y así como diurético, carminativo, estimulante digestivo y antiulceroso. Dentro de sus efectos farmacológicos comprobados, se refiere que el aceite esencial en concentración de 20 mg/ml muestra actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Mycobacterium smegmatis*. Achenbach y col (1984) demostraron que los extractos butanólicos, clorofórmico y de éter de petróleo presentan actividad hipotensiva. En Haití las hojas de *Piper aduncum*, en forma de cocimiento, son utilizadas por la vía peroral para los golpes, así como también para dolores abdominales (Pálacios V., 1993), reporta que en el Perú es utilizada para infecciones e inflamaciones.

La presente investigación ha evaluado el efecto de las hojas de *Piper angustifolium* R y P sobre la úlcera gástrica inducida en animales de experimentación, a fin de llegar a conclusiones que permitan su aplicación en pacientes. Con esa finalidad se establecieron los siguientes objetivos:

- Comprobar si los extracto acuoso, y alcohólico de la hojas de *Piper angustifolium* R y P protegían o mejoraban las lesiones de piel inducidas en ratones, mediante administración peroral y tópica;
- Comprobar la toxicidad aguda mediante la determinación de la dosis letal 50 (DL50) del extracto acuoso, alcohólico y el polvo micronizado,
- Evaluar la toxicidad subcrónica, observando posibles reacciones adversas o tóxicas en órganos como el cerebro, riñón, hígado, pulmones, corazón, etc. (mediante estudios histológicos);
- Observar la influencia sobre elementos normales de la sangre, perfil lipídico, enzimas como las transaminasas, fosfatasa; úrea, creatinina sérica; asimismo en las proteínas plasmáticas;
- Demostrar que los extractos acuoso, alcohólico y el polvo micronizado de las hojas, tienen actividad citoprotectora gástrica a diferentes dosis, y mediante administración peroral, frente a lesiones gástricas inducidas por indometacina, estrés y píloro ligado;
- Realizar el fraccionamiento del extracto alcohólico, para determinar la fracción más activa como antiulcerosa,
- Identificar los principales metabolitos secundarios responsables del efecto antiulceroso.

GENERALIDADES

Piper angustifolium R. & P.: La planta fue recolectada en el bosque del anexo de Santa Rosa de Hunac del distrito de Huariaca, provincia de Pasco, departamento de Cerro de Pasco, en agosto de 1995. Taxonómicamente ha sido identificada como *Piper aduncum* L., cuyo sinónimo es *Piper angustifolium* R. & P., según la constancia dada por la Dirección del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; la determinación sistemática se hizo siguiendo el sistema de clasificación de Engler y Prant, modificado por Melchior en 1964, confirmando Brako y Zarucchi; es necesario recordar, que existen cerca de 493 especies de *Piper* (Soukup, 1982).

DIVISION	: Angiospermas
CLASE	: Dicotiledóneas
SUBCLASE	: Archiclamideas
ORDEN	: Piperales
FAMILIA	: Piperaceae
GENERO	: <i>Piper</i>
ESPECIE	: <i>Piper aduncum</i> L.
SINONIMIA	: <i>Arthante elongata</i> (M. Vahl) Miquel;

Piper angustifolium R. & P., 1798; *Piper elongatifolium* Trelease; *P. elongatum* M.Vahl. var. *elongatum*; *P. elongatum* var. *pampayacusum* Trel. *Piper lineatum* var. *hirtipetiolatum* Trel. ; *Piper purpurascens* D. Dietrich, 1839; *Piper reciprocum* Trelease; *Steffensia elongata* (M. Vahl) Kunth. **Nombre vulgar:** Matico (MacBride, 1937); Cordoncillo, Moho-moho, Hierba de soldado (Soukup

Esta planta es oriunda de la selva, siendo también cultivada en la Costa y la Sierra, y por influencia de las condiciones ambientales, adopta formas típicas del lugar, por ello las hojas de la zona de recolección, son más ásperas que de costa y selva. En la ciudad de Huariaca, lugar de recolección de la planta, los pobladores la utilizan para cicatrizar heridas externas.

Distribución geográfica. Figura N° 01.

Distribución Geográfica del *Piper angustifolium* R & P
(Se desarrolla entre 0 a 3000 metros sobre el nivel del mar)
⊙ Huarica ⊙⊙⊙ Otros Lugares



El estudio histológico a nivel epidérmico, confirma que la especie estudiada pertenece a las dicotiledóneas, y al no evaluar otras partes del vegetal como los pelos no se pudo profundizar en otros aspectos botánicos específicos; así mismo reveló la presencia de zonas secretorias, en gran cantidad, posiblemente por la presencia de abundante aceite esencial presente en las hojas de la planta en estudio; al respecto Burgos M J y col (1987); así como Díaz D y col, (1984) reportan que la hoja de *Piper aduncum* L, contiene un aceite esencial rico en lignanos: dilapiol, miristicina y un derivado del benzodioxol, monoterpenos: piperitona y alcanfor.

El espécimen en estudio, al ser comparado con la figura de *P. aduncum* L de Jiménez 35, JBSD, son semejantes, tanto en la forma como en la nervadura de la hoja. La especie de Huariaca posee hojas más anchas que la de Jiménez con limbo asimétrico, pinnatinervado, reticulación secundaria; las nervaduras secundarias alternas; nervación pronunciada hacia el envés. La planta posee hojas alternas con nudos prominentes y entrenudos amplios; las yemas presentan estípulas. Ver Fotografías N° 01 y 02

Característica foliar de *Piper aduncum* L (descripción del material): las hojas de *Piper aduncum* L, se caracterizan por ser simples, en donde la lámina es asimétrica en la base. La forma es oblonga lanceolada (con promedios de longitud 13,5 y ancho 6,5 cm). Según Dreyffus (1990), el ápice se caracteriza por ser acuminado, indica que es atenuado, señalando que no se aprecia un acumen característico), el margen es de borde entero, la textura de la hoja es cartácea a manera de un papel, áspera al tacto, medianamente pecioladas.

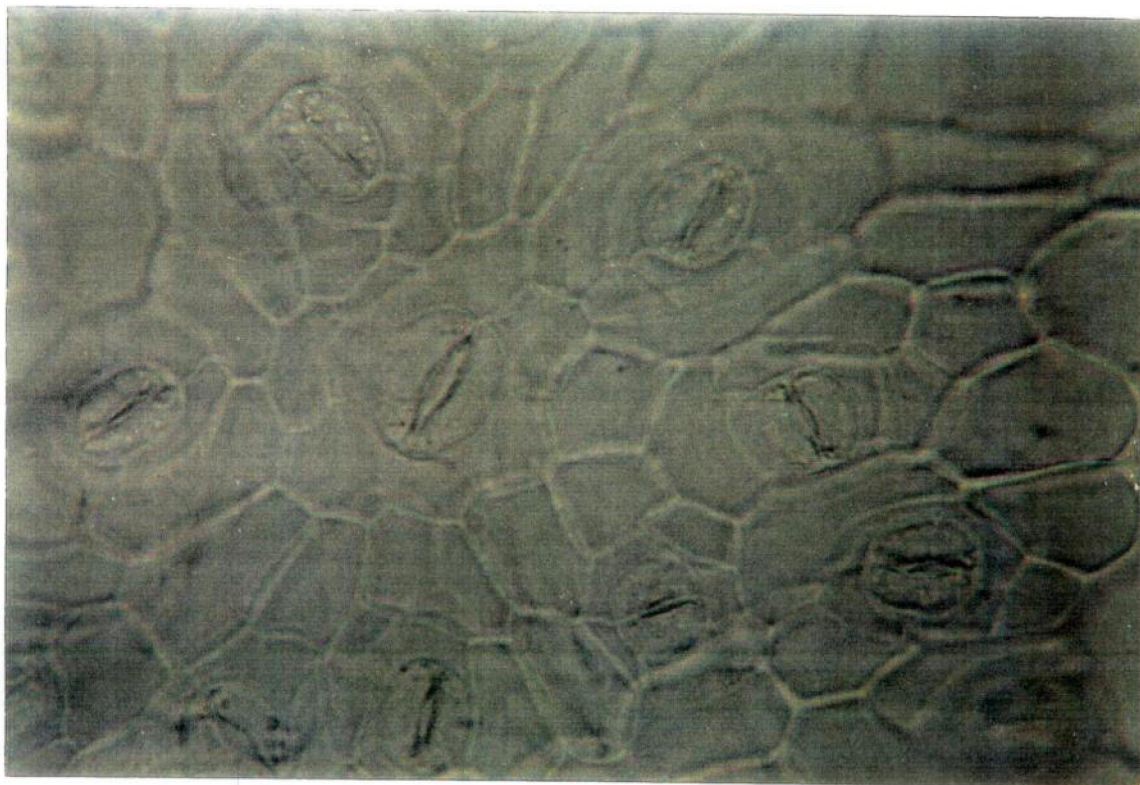
Al efectuar un estudio histológico preliminar del tejido epidérmico, se observa estomas anomocíticos (varias células alrededor del estoma) a nivel del envés (Fotografía N° 03); en la Fotografía N° 04, se aprecia, que en el haz no presenta estomas y se observa una zona coloreada debajo del parénquima empalizado indicando una zona secretoria.



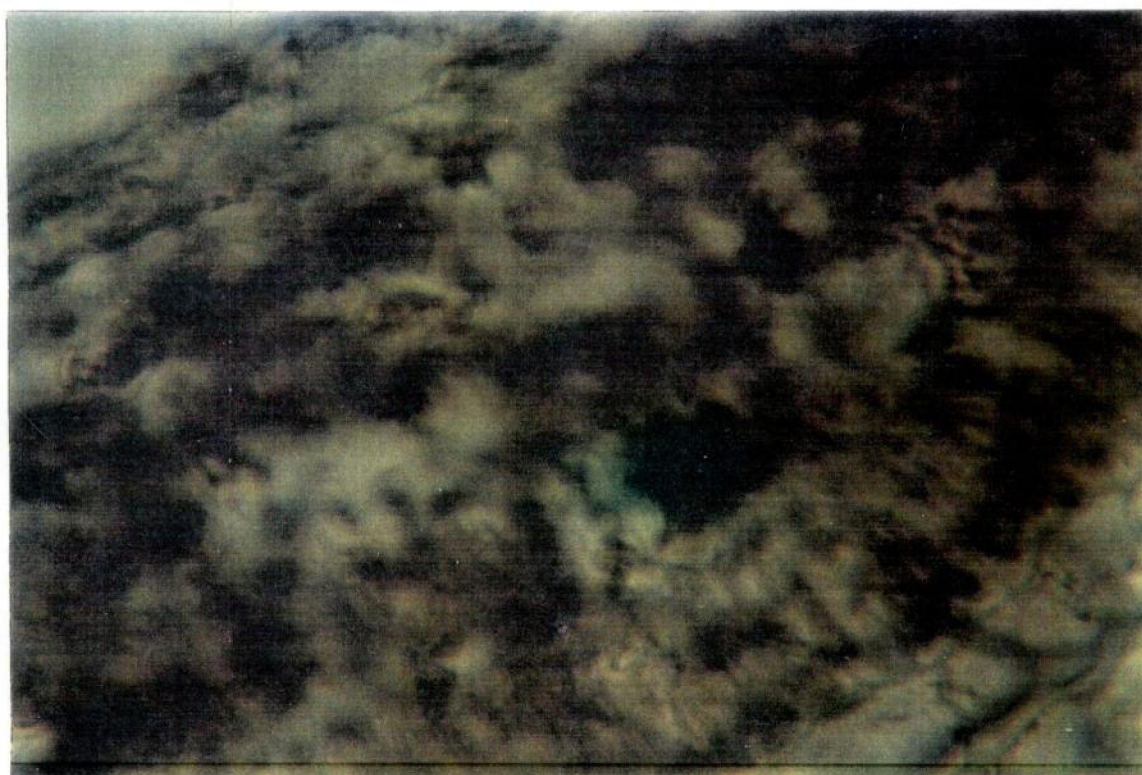
Fotografía Nro 01: Vista del haz de la hoja de *Piper angustifolium* R & P



Fotografía Nro 02: Vista del envés de la hoja de *Piper angustifolium* R & P



Fotografía Nro 03: Vista de estomas en hoja de *Piper angustifolium* R & P



Fotografía No 04: Vista de glándula secretoria en hoja de *P.angustifolium* R & P

Factores etiológicos de la úlcera péptica

La úlcera péptica, es una lesión de la mucosa gastrointestinal que penetra la muscularis mucosa; en el estómago, píloro, bulbo duodenal, esófago, duodeno posbulbar; casi siempre es por hiperacidez, y se presenta en hipoacidez si el agente causal es el *Helicobacter pylori*.

Frecuencia de la úlcera péptica: En opinión de algunos investigadores, un 5 a 10% de personas la padece durante su vida (DeCecil, 1992), según otros 10 a 15 % (Espejo y col 1995). Es más común la duodenal sintomática que la gástrica sintomática tanto en hombres (5,5 a 1) como en mujeres (2,8 a 1). Los hombres desarrollan más frecuentemente úlcera duodenal, en cambio la gástrica es igual en ambos sexos. La úlcera duodenal suele manifestar los primeros síntomas entre los 25 y 55 años (ocurrencia máxima a los 40) y la gástrica mas bien entre los 40 y 70 años (con media de los 50).

Síntomas y signos de la úlcera péptica

A. Sintomatología típica con dolor

1. Dolor epigástrico: se localiza en una zona circunscrita al epigastrio o sus proximidades, especialmente en la xifoidea, cuando la úlcera es alta o está en el esófago (úlcera de Barrett); puede irradiarse o localizarse, hacia abajo y a la derecha cuando es duodenal, o al dorso si es penetrante.
2. Dolor con ritmo circadiano, se presenta en periodos alejados de las comidas, 2 a 3 horas después de ellas, entre las 10 a 12 y 16 a 17 horas, típicamente no se presenta antes del desayuno, calma fácilmente con la ingestión de alimentos, antiácidos o el vómito. En el llamado dolor a "tres tiempos"(úlcera duodenal) el síntoma no disminuye espontáneamente; en cambio en tipo de dolor "cuatro tiempos"(úlcera gástrica) existe una remisión o disminución, sin ingerir alimentos.
3. Cronicidad, con periodicidad desconcertante; tiene ciclos con remisión espontánea, se presenta con frecuencia en cambios estacionales.

B. Sintomatología tipo dispéptico: Pirosis, náuseas o asco, sialorrea o ptialismo, llenura precoz, dispepsia(con náusea, vómitos, plenitud, timpanismo, dolor)

C. Dolor no característico: asociada a gastritis crónica y reagudizada, etc.

Tratamiento farmacológico de la úlcera péptica: Antisecretorios (antagonistas de receptores H₂; antimuscarínicos; prostaglandinas; benzoimidazoles sustituidos), antiácidos, citoprotectores (sucralfato, bismuto coloidal), antibióticos.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL :

A. MATERIAL BIOLOGICO

- 1 Hojas de *Piper angustifolium* R. y P.;
- 2 Ratas albinas consaguíneas cepa Holtman, de ambos sexos, de 4 a 3 meses de edad, con 250 g de peso corporal promedio al inicio del estudio, fueron sacrificadas por dislocación cervical;
- 3 Ratones albinos consaguíneos, cepa Balb C 53, de ambos sexos, con uno a dos meses de edad, de 20 a 25 g de peso corporal promedio al inicio del estudio, fueron sacrificados por dislocación cervical.

B. REACTIVOS

- | | |
|---|--------------------------------|
| 1 Etanol de 96 ° | 2 Pentobarbital al 6,5 % |
| 3 Indometacina Merck | 4 Hematoxilina-eosina |
| 5 Hidróxido de soda 0,085 N | 6 Fenoltaleína Q.P. |
| 7 N-hexano Q.P. | 8 Metanol Q.P. |
| 9 Cloroformo Q.P. | 10 Bismuto coloidal (Bismutol) |
| 11 Acido sulfúrico Q.P. | 12 Acido clorhídrico Q.P. |
| 13 Neomicina, bacitracina, glicina, L-cisteína, DL-treonina: (Cicatrín) | |
| 14 Sales del ácido tioglicólico (Crema depilante suave, Opilca) | |
| 15 Polyoxyethylenesoorbitan monooleate Sigma (TWEEN 80). | |
| 16 Cromatoplasmas de sílica gel G-60 (MERCK) | |

C. EQUIPOS DE LABORATORIO

- | | |
|---|------------------------|
| 1 Sonda metálica para administración peroral; | |
| 2 Horno micondas Goldstar | 3 Bomba de vacío |
| 4 Columna de cromatografía | 5 Cromatoplasmas |
| 6 Balanza analítica | 7 Dinamómetro nacional |
| 8 Jaulas anticoprogénicas; | 9 Equipo de disección; |
| 10 Espectrofotómetro Coleman | |

METODOLOGIA

A. RECOLECCION, ESTABILIZACION, Y DESECACION DE LA PLANTA

Las hojas colectadas de la ciudad de Huariaca sobre los 3000 m.s.n.m. fueron limpiadas con cuidado y estabilizadas. Para la estabilización, se colocaron en bolsas plásticas añadiéndose gotas de alcohol de 96°, se cerró la bolsa y se agitó. Se las desecó colocando unos 20 gramos de hojas en el horno de microondas por 3 minutos.

B. ESTUDIOS FARMACOTECNICOS

1. Preparación del polvo micronizado: Las hojas secas fueron pulverizadas y tamizadas, en malla N° 120, con diámetro de luz de 0,132 mm, según sistema MESH de los EEUU.
2. Para obtener las características físicas del polvo micronizado, se ha hecho lo siguiente:
 - a. Determinación del porcentaje de humedad, mediante pesado y secado a estufa, hasta peso constante.
 - b. Determinación de la densidad real del polvo micronizado
 - c. Determinación del tamaño de partículas, a través de:
 - 1) Análisis granulométrico
 - 2) Distribución de partículas por tamización
 - 3) Volumen promedio de cada partícula
 - 4) Determinación del peso promedio de cada partícula en cada uno de los tamices.
 - 5) Determinación del número de partículas.

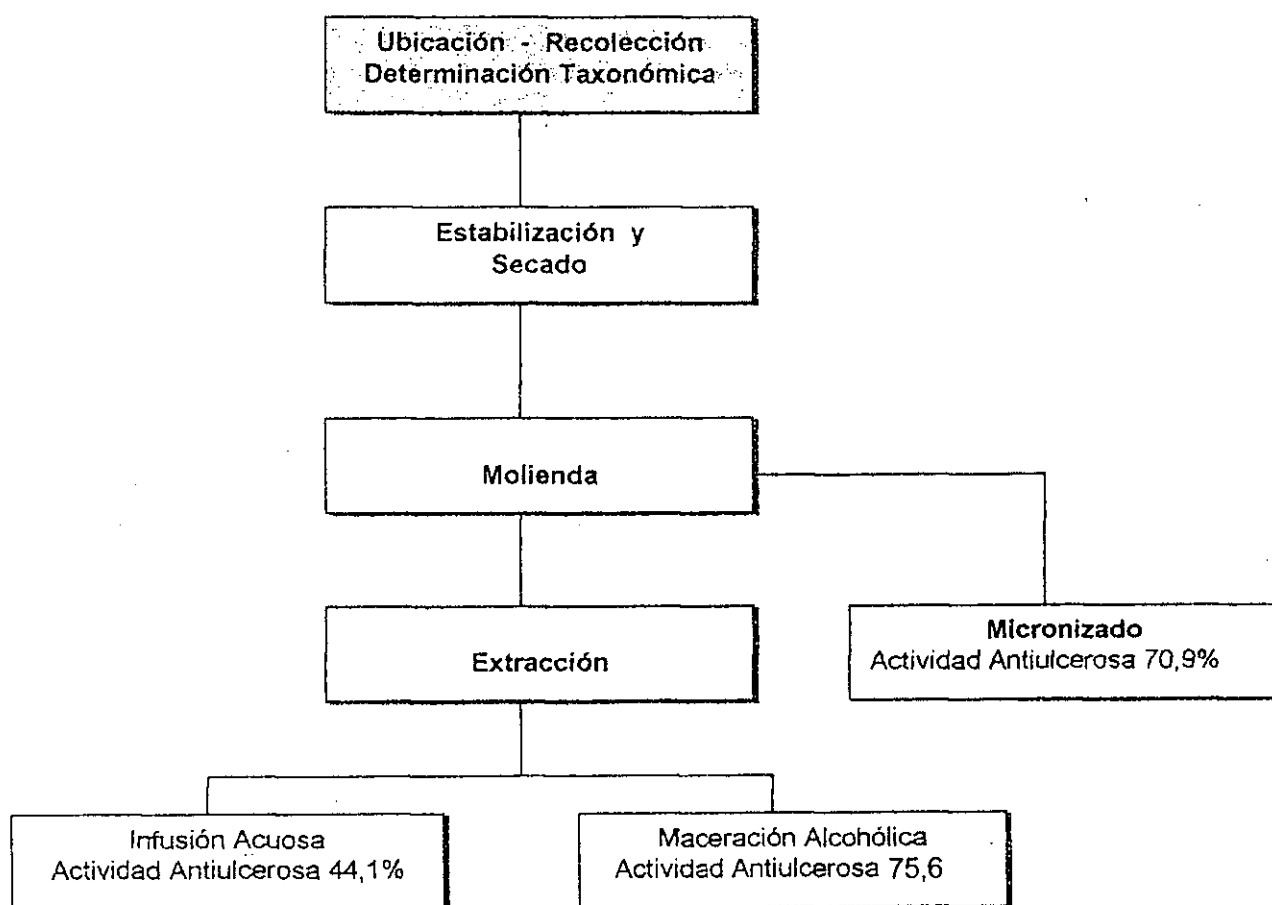
3. Formulación de cápsulas con polvo micronizado

Con el polvo de las hojas se formuló las cápsulas de 250 mg

C. PREPARACION DE EXTRACTOS ACUOSO Y ALCOHOLICO

1. Extracto acuoso, 100 g de hojas secas y molidas, se sometieron a infusión, luego se filtró; y se desecó mediante refrigeración a 5 °C por tres días.
2. Extracto alcohólico, 100 g de hojas secas y molidas se maceró en alcohol de 96° , por 8 días; luego se filtró y se desecó a temperatura ambiente por 3 días.

Diagrama de Flujo para la preparación de la muestra, extracción de constituyentes químicos y actividad antiulcerosa de las hojas de *Piper angustifolium* R o P (matico)



D. ESTUDIO FITOQUÍMICO PRELIMINAR

La detección de metabolitos secundarios, se realizó mediante pruebas fisicoquímicas, de caracterización, (Lock, 1988)

E. MARCHA FITOQUÍMICA

El extracto alcohólico (3 gramos), de las hojas de *Piper angustifolium*, fue sometido a un proceso de partición, por el método de cromatografía en columna rápida. Se sembró el extracto en una columna de sílicagel para cromatografía y se corrió, utilizando los solventes de menor a mayor polaridad, (n-hexano, cloroformo y metanol); los eluatos resultantes fueron secados a temperatura ambiente; recibiendo los nombres de fracción A = n-hexano (rinde 0,8 g), fracción B = clorofórmico (rinde 0,6 g) y fracción C = metanólico (rinde 1,3 g). Con estas fracciones se realizaron ensayos farmacológicos.

La fracción B, por resultar más efectiva farmacológicamente, se procedió a fraccionar, por igual procedimiento, utilizando cloroformo y metanol como solventes; los productos obtenidos recibieron los nombres de subfracción clorofórmica ó fracción D (rinde 0,35 g) y metanólica o fracción E (rinde 0,3 g); la subfracción clorofórmica resultó ser más efectiva, se le fraccionó, con n-hexano (fracción F), cloroformo (fracción G) y metanol (fracción H) cuyos rendimientos fueron 0,12 g; 0,11 g y 0,6 g respectivamente, resultando ser más activa la fracción H.

Las fracciones fueron sometidas a CCF en sílica gel G-60 (fase fija); siendo los solventes el cloroformo y metanol 9:1 y el revelador la luz ultravioleta, amoníaco, ácido sulfúrico, cloruro de aluminio, etc.

ESTUDIOS PRECLINICOS

A. ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA

DETERMINACION DE DOSIS LETAL 50 (DL50) POR VIA PERORAL. Se tomaron 150 ratones albinos, formándose 25 grupos al azar de seis animales cada uno, un grupo recibió el solvente (para el extracto acuoso y polvo micronizado fue agua destilada, y para el alcohólico fue una solución de tween al 5% en agua destilada) que ayudó a disolver los extractos y el polvo micronizado; a 10 grupos se les administró dosis crecientes de extracto alcohólico; siete grupos recibieron extracto acuoso y a los siete últimos se les dió el micronizado; hasta producir la muerte de todo el grupo. Se tuvo en cuenta el criterio de Williams para la calificación de los resultados de DL50 (mg/kg); la sustancia es extremadamente tóxica si la DL50 es <1 mg/kg; altamente tóxica <50 mg/kg; moderadamente tóxica <500 mg/kg; ligeramente tóxica < 5000 mg/kg; prácticamente no tóxica <15000 mg/kg; y relativamente inocua > 15000 mg/kg.

B. ENSAYO PARA DETERMINAR DOSIS EFECTIVA MEDIA (DEM). Se obtuvo con datos del efecto cicatrizante, vía peroral en ratones: 50 mg/kg

C. ENSAYO DE TOXICIDAD SUBCRONICA, CON DOSIS EFECTIVA MEDIA. 24 ratas se dividieron en tres grupos de ocho animales cada uno; el primero recibió suero fisiológico a la dosis de 2 ml/kg; el segundo 15 mg/kg y el tercero 50 mg/kg del extracto acuoso; por vía peroral, durante tres meses; luego se les sacrificó para realizar estudios macroscópicos y anatomohistológicos de los diferentes órganos y tejidos a fin determinar algún daño o lesión.

D. ACTIVIDAD CICATRIZANTE

Se utilizó el método de Vaisberg y col, (1989). A 136 ratones albinos, distribuidos al azar en 17 grupos, se les depiló el lomo con un depilatorio comercial, después de un reposo de 24 horas, se realizó una incisión a todos los animales, luego se les aplicó tópicamente dos veces al día los extractos bajo la forma de gel, excepto al control, por 72 horas, luego se les eliminó, y procedió a medir la fuerza o tensión en gramos (g) que abrían la herida cicatrizada con un dinamómetro.

Ensayo cicatrizante por administración oral:

Ochentaiocho ratones tomados al azar, se dividieron en once grupos de ocho animales cada uno; el primero control se le administró solución de tween al 1 % a la dosis de 5 ml/kg (agua destilada para el acuoso y solución de tween al 1 % en agua destilada para el alcohólico); 5 grupos recibieron extracto acuoso, a las dosis de 50 mg/kg, 100 mg/kg, 150 mg/kg, 200 mg/kg, 250 mg/kg; y a los últimos cinco grupos se les dió extracto alcohólico a las dosis de 50 mg/kg, 100 mg/kg, 150 mg/kg, 200 mg/kg, 250 mg/kg respectivamente.

Ensayo cicatrizante por administración tópica: Se distribuyeron al azar cuarentaiocho ratones al azar en seis grupos de ocho animales cada uno; el primero fue control, recibiendo por vía tópica el vehículo sin extractos; el segundo y tercero recibieron extracto acuoso; el cuarto y quinto extracto alcohólico, ambos en gel al 10 % y 20 % ; y el último grupo se le dió cicatrin crema, usado como patrón farmacológico.

E. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIULCEROSA

1. CITOPROTECTORA (O'Brien, 1990)

Para este ensayo se tomaron 40 ratas albinas en ayunas de 24 horas, distribuyéndose al azar en 5 grupos de ocho animales cada uno, a todas se les administró indometacina VIP 60 mg/kg; una hora después recibieron dos dosis repartidas en 24 horas; un grupo control recibió el vehículo que suspendió los extractos en dosis de 5 ml/kg; el

segundo, tercero y cuarto se les dió el extracto acuoso, micronizado y alcohólico respectivamente por vía peroral a la dosis de 100 mg/kg; en tanto que el quinto recibió bismuto a la dosis 1,5 ml/kg vía peroral. Se eliminó los animales una hora después de la última administración, se disecó los estómagos para evaluar: número y tamaño de lesiones de la mucosa gástrica.

Lesiones inducidas por estrés: A 32 ratas albinas, se les agrupó al azar en cuatro grupos de ocho cada uno, se les administró extracto acuoso, micronizado y estándar, conservando un grupo control, para luego inducir las lesiones por estrés; mediante el método de Bonfil, que consiste en envolver a las ratas en una malla metálica y suspenderlas en el aire, mediante un soporte metálico. Luego se les eliminó y se observaron los estómagos.

Índice ulceroso. Se calculó el índice ulceroso (IU) para cada animal, mediante la suma del total de lesiones dado en cada uno, dividido por el número de muestra utilizado; se determinó el porcentaje de inhibición del índice ulceroso (%IU), considerando los conceptos de índice ulceroso del control (IUc) e índice ulceroso del problema (IUp).
Luego:
$$\%IU = \{ [(IUc - IUp)/IUc] 100 \}$$

Escala convencional para calificar el grado y aspecto de la mucosa sometida a inducción de úlcera gástrica.

GRADO	ASPECTO DE LA MUCOSA
0	Normal
LEVE	Ligero edema y congestión
MODERADO	Regular edema, congestión y sangrado
SEVERO	Puntos de erosión, con edema, congestión y sangrado
INTENSO	Marcadas erosiones, pequeñas, amplias y extensas

Escala para calificar el grado de úlcera gástrica según el índice ulceroso (IU)

PARA RATAS				/	PARA RATONES			
IU	0	=	Normal	/	IU	0	=	Normal
IU	<10	=	Leve	/	IU	<3	=	Leve
IU	10-20	=	Moderado	/	IU	3-6	=	Moderado
IU	20-30	=	Severo	/	IU	7-10	=	Severo
IU	>30	=	Intenso	/	IU	>10	=	Intenso

2. ENSAYOS DE ANTISECRECION: PILORO LIGADO

(Long J. y col, 1983) A 32 ratas albinas se les dividió al azar en cuatro grupos de 08 cada uno; un grupo fue control que sólo recibió el vehículo que redisolvió a los extractos (Solución de tween 80 al 1 %, a la dosis de 5 ml/kg); al segundo y tercero se les administró el extracto acuoso y alcohólico por vía intraperitoneal (VIP) a la dosis de 100 mg/kg; en tanto que el cuarto grupo recibió ranitidina a la dosis 10 mg/kg VIP. Luego de una hora, se les ligó el píloro, quedando así durante cuatro horas; después fueron sacrificados, para evaluar el volumen y el número de mEq/lit de iones hidrógeno presentes en la secreción gástrica; el mEq/lit de H⁺, mediante el método volumétrico utilizando hidróxido de sodio 0,085 normal y fenoltaleína como indicador. Se determinó el porcentaje de inhibición de secreción (% IS) teniendo en cuenta el volumen de secreción del control (VSc) y el volumen de secreción del problema (Vsp):

$$\% IS = \left[\frac{(VSc - VSp)}{VSc} \right] 100$$

También se determinó la cantidad de proteínas totales presentes en la secreción gástrica, a través del método colorimétrico, que se funda en que los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con el ión cúprico, en medio alcalino, para dar un complejo color violeta con máxima absorción a 540 nm, la intensidad es proporcional a la concentración de proteínas totales en la muestra.

G. ACTIVIDAD ANTIULCEROSA EN RATONES

Se utilizó el método de Cashin y col (1977) según el cual, a los animales previo ayuno de 24 horas según el cual se les administró indometacina 60 mg/kg, por VIP; una hora después se administró los extractos en dosis única de 200 mg/kg, VIP. Seis horas después los ratones, fueron eliminados, se expusieron los estómagos, la mucosa gástrica fue evaluada, según la siguiente escala arbitraria: 0 = no lesión; 0,5 = hiperemia; 1 = una o dos lesiones leves; 1,5 = mas de dos lesiones; 2 = lesiones severas; 3 = lesiones mas severas; 4 = lesiones severas y hemorrágicas. Se tuvo un grupo control de referencia, el que sólo recibió el vehículo que suspendió los extractos (Solución de tween 80, al 1 %, a la dosis de 5 ml/kg); a otro grupo se le administró bismuto coloidal a la dosis de 1,5 ml/kg, utilizado como patrón farmacológico.

ENSAYOS CLINICOS

A. INDICE DE IRRITABILIDAD (II)

Se tomaron 60 voluntarios entre hombres y mujeres cuyas edades estaban comprendidas entre 20 y 45 años, todos de raza mestiza, con vínculos de consanguineidad. Se distribuyeron al azar, en tres grupos de 20 personas cada uno, a quienes se les limpió el antebrazo con agua y se indujo inflamación mediante la adhesión a la piel de un trozo de cinta adhesiva ancha, y por el retiro brusco de ésta, repitiéndose la operación diez veces, para obtener una zona inflamada la cual se cubrió de acuerdo a la siguiente distribución: el primer grupo recibió pincelaciones de agua destilada; el segundo y tercero lo hizo con soluciones del 25 y 50 %, respectivamente del extracto acuoso.

B. TRATAMIENTO DE LA ULCERA PEPTICA

Fue un estudio clínico prospectivo de fase I (Vincent T de Vita 1993). En la determinación del tamaño de la muestra se eligieron doce pacientes por tratarse de una evaluación preliminar (Alan Spried y col 1994), el seguimiento clínico farmacológico fue en pacientes ambulatorios que sufrían de enfermedad ulcerosa péptica. Se tomó en cuenta solamente el diagnóstico clínico y la evolución bajo el tratamiento. Los criterios a evaluar fueron los signos y síntomas, que a continuación se exponen: 1. Dolor epigástrico; 2. Dolor con ritmo; 3. Periodicidad; 4. Dispepsia; 5. Pirosis; 6. Náuseas; 7. Sialorrea; y 8. Llenura precoz. Utilizándose como escala de evaluación cualitativa: 0 = no presencia de signos y síntomas; 1 = leve presencia de signos y síntomas; 2 = moderada presencia de signos y síntomas; y 3 = presencia severa de signos y síntomas.

Los pacientes se sometieron al programa por voluntad propia, y además cuando tenían una calificación de signos y síntomas entre 3 y 2 según la escala de Liker utilizada en la evaluación de los datos (Kerlinger F. 1987); el tratamiento duró 30 días, administración por vía peroral, de 2 cápsulas de 250 mg del micronizado cada seis horas.

RESULTADOS

4.1 EN EL ESTUDIO FARMACOTECNICO Y FITOQUIMICO

ESTUDIO FARMACOTECNICO: se obtuvo polvo micronizado con las siguientes características:

1. Humedad 12,01% y el diámetro promedio de la mayor parte de las partículas se halla alrededor de 86,9 micrones. Se prepararon cápsulas, de $251,0 \pm 14,7$ mg del polvo micronizado; y el rendimiento del residuo seco fue en promedio de $60,7 \pm 3,56$ mg, equivalente a 24,18 % (250 mg del micronizado de hojas de *P. angustifolium* rinden en promedio 60,7 mg de extracto acuoso).
2. El extracto acuoso con leve olor aromático, tuvo un rendimiento de 6,98% y el extracto alcohólico, presentó un rendimiento de 5,55%.
3. Según la medicina popular para su empleo, como antiulceroso: se toman cinco hojas secas, con peso promedio de $3,82 \pm 0,17$ g; las mismas que en infusión rindieron un promedio de $574,3 \pm 22,1$ mg de residuo seco, equivalente a un 15,26%

ESTUDIO FITOQUIMICO

1. Los hallazgos del estudio fitoquímico cualitativo, realizados en los extractos alcohólico y acuoso, se presentan en el Cuadro N° 1 Del fraccionamiento del extracto alcohólico, según la actividad farmacológica: se obtuvieron dos fracciones con actividad antiulcerosa (G y H), las cuales demostraron que los metabolitos secundarios constituidos por compuestos fenólicos y flavonoides, presentes en estos extractos eran los responsables de la actividad farmacológica.

El estudio cromatográfico de la fracción H, y frente a patrones de referencia reveló la presencia de hesperidina (flavanona) y rutina (glicósido de flavonol); el estudio de la fracción G, mostró la presencia de isoflavonas.

4.2. ESTUDIO PRECLINICO

A. Toxicidad aguda en ratones:

La dosis letal 50 para el extracto acuoso y el micronizado estuvo para ambos sobre los 15 000 mg/kg, ya al administrarse hasta esa dosis por vía peroral, no se produjo la muerte de los animales. El extracto alcohólico administrado por vía peroral, a dosis bajas permitió observar que los animales mostraron buen estado general; con dosis altas, se evidenciaron signos de irritabilidad, convulsión y muerte dentro de las 12 horas. Por el cálculo de probit, se obtuvo una DL50 de 2 366,2 mg/kg (Intervalo de confianza al 95 %: 1 613,5; 2 941,7).

B. La dosis efectiva media (DEM) Este ensayo, se realizó sólo para el extracto acuoso (por su mayor empleo popular); y al evaluar el efecto cicatrizante, se observó efectividad con los diferentes niveles de dosis ensayadas, por ello se tomó la dosis de 50 mg/kg

C. Observación de posibles lesiones con la DEM

1. Estudio anatomohistológico

Los estudios revelaron que los órganos tenían una imagen histológica normal (Fotografías N° 9 a 12)

2. Exámenes de laboratorio

En los Cuadros N° 2 y 3 se muestran los resultados de los valores séricos y elementos de la sangre, después de administrar el extracto acuoso de las hojas de *Piper angustifolium* R y P, por vía peroral durante 3 meses a ratas albinas, a dosis de 15 y 50 mg/kg. Los valores fueron evaluados y analizados por técnicas estadísticas (MANOVA y ANAVA), dando una diferencia estadísticamente significativa (F Aprox.: p.value < 5 %); observandose que las proteínas no han sufrido variación, con relación al grupo control, pero si hay disminución del colesterol, en los grupos que han recibido tratamiento.

D. Actividad cicatrizante

En el Cuadro N° 4, se observa el efecto cicatrizante en ratones con los extractos acuoso y alcohólico de *Piper angustifolium*, administrados una vez al día; observándose que fue necesaria mayor fuerza de tensión, expresada en gramos, para abrir la lesión tratada con el extracto alcohólico (71,0 y 59,6 gramos, por vía tópica y oral respectivamente) para abrir la herida cicatrizada, con un nivel de significación del 5 % (Estadística $F=32,136 > F(5,106; 5 \%)$).

E. Observación de la actividad antiulcerosa.

En el Cuadro N° 5, se muestra mayor inhibición del índice ulceroso con el extracto alcohólico, por ello se procedió a su fraccionamiento hasta obtener la fracción H, la que mostró buena actividad citoprotectora; y mediante la prueba de significancia multivariada de Hillais $F = 168,00$ ($p = 0,001$). En esta, se observa disminución del número de lesiones gástricas, y una reducción del índice ulceroso en los animales que recibieron tratamiento con matico comparativamente a los controles.

El Cuadro N° 6, indica que en los tratamientos existe un grado de edema y congestión de la mucosa gástrica, que fue de leve a moderado, en tanto que el control mostró un grado intenso. El estudio anatomohistológico comparativo de los estómagos mostró que, las ratas normales presentaron una mucosa conservada, una unión íntima entre la submucosa y muscularis, y la adventicia bien definida (Fotografías N° 5 y 7); los animales que recibieron indometacina una hora antes de la administración de los extractos, como agente inductor de lesiones gástricas, presentaron una metaplasia esofágica y gástrica, hipertrofia de la mucosa gástrica, edema bien marcado en la muscular, con infiltración a células mononucleares (similar a una lesión crónica), zonas hemorrágicas en la submucosa (Fotografía N° 6); en tanto que los animales que recibieron tratamiento, presentaron la mucosa conservada, con discreto detritus en la luz (partículas

microscópicas), edema de submucosa no continua, discreta inflamación, hiperemia de adventicia (Fotografía N° 8).

En el Cuadro N° 7, se evidencia que el extracto alcohólico produce una reducción de la secreción ácida gástrica en un 53,5 %.

El Cuadro N° 8, muestra el resultado de dosaje de proteínas de la secreción gástrica, obtenido por el procedimiento de píloro ligado, apreciándose una elevación de las mismas en los animales bajo tratamiento con el extracto alcohólico de las hojas de *Piper angustifolium*, al compararlo con el grupo control.

En el Cuadro N° 9, se exponen los resultados obtenidos al inducir úlcera gástrica por estrés (Método de Bonfils) en ratas, indicándonos un grado de protección significativo con el extracto alcohólico de las hojas de *Piper angustifolium*.

4.3. EXPERIENCIAS CLINICAS PRELIMINARES

A. INDICE DE IRRITABILIDAD

En este ensayo se observa, una influencia significativa del extracto acuoso de las hojas de *P. angustifolium* R. & P., el cual es dependiente de la concentración (Cuadro N° 10), sobre la irritabilidad producida en los sujetos, a un nivel de significancia del 5% (Estadística F: p.value = 0,0001 < 5%)

B. OBSERVACIONES SOBRE LA ULCERA PEPTICA EN PACIENTES

En el Cuadro N° 11, y figura 1, se observa el análisis estadístico de los resultados, obtenidos de los pacientes con enfermedad ulcerosa péptica bajo tratamiento con el micronizado de matico (2 cáps. de 250 mg, cada 6 horas, por un mes, siendo significativos, a un nivel de confianza del 5 %, con $p < 0,001$; y las variaciones de los signos y síntomas de la enfermedad ulcerosa péptica, con una tendencia a la disminución de los puntajes, según la escala de Likert utilizada.

Cuadro N° 1

Estudio fitoquímico preliminar de los extractos acuoso y alcohólico de las hojas de *Piper angustifolium* R & P (Matico)

Sustancia	Acuoso	Alcohólico	A	B	C	D	E	F	G	H
Alcaloides Dragendorff	+	+	-	++	+++	+	+	+	++	-
Flavonoides Shinoda	++	+++	+	+++	+++	+++	++	++	+	++
Saponinas In- In de espuma	++	++	-	+	+	+	+	-	-	-
Fenólicos Cl férrico	+++	+++	++	++	++	++	++	++	+++	+++
Aceites Olor	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
Taninos Gelatina	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Esteroides L.Burchard	--	++	-	-	-	-	-	++	++	+
Aminoácidos Ninhidrina	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Quinonas Burtranger	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

(-) = Ausente

(+) = Poca cantidad

(++) = Regular cantidad

(+++)= Abundante cantidad

Cuadro N° 2

Resultados de los exámenes de laboratorio clínico, después de tres meses de administración diaria, por vía peroral, del extracto acuoso a ratas albinas.

N°	EXAMENES DE LAB. CLINICO	GRUPO CONTROL (VM \pm DE)	GRUPO a 15 mg/kg (VM \pm DE)	GRUPO a 50 mg/kg (VM \pm DE)
01	Proteínas totales	7,0 \pm 0,6	7,5 \pm 0,4	7,0 \pm 0,4
02	Albúminas	4,1 \pm 0,3	4,0 \pm 0,2	3,9 \pm 0,2
03	Globulinas	2,9 \pm 0,6	3,4 \pm 0,3	3,2 \pm 0,3
04	Creatinina	1,4 \pm 0,3	1,5 \pm 0,2	1,2 \pm 0,1
05	Urea	49,5 \pm 1,5	61,6 \pm 9,7	66,3 \pm 11,9
06	Colesterol	130,4 \pm 20,2	130,7 \pm 14,5	107,9 \pm 20,2
07	Triglicéridos	52,9 \pm 12,3	34,2 \pm 5,9	40,7 \pm 15,4
08	Lípidos	339,4 \pm 46,8	307,7 \pm 32,7	301,0 \pm 69,2
09	Fosfatasa alcalina	3,9 \pm 0,6	4,6 \pm 0,7	3,5 \pm 0,3
10	Transaminasa GO	81,3 \pm 13,2	73,0 \pm 7,8	80,6 \pm 5,7
11	Transaminasa GP	61,25 \pm 14,9	77,5 \pm 11,1	82,7 \pm 14,4
12	Velocidad sedimen	2,4 \pm 0,5	2,8 \pm 0,9	3,3 \pm 0,5
13	Hemoglobina	11,3 \pm 0,9	11,3 \pm 0,6	12,8 \pm 0,4
14	Hematocrito	36,4 \pm 1,4	39,0 \pm 1,7	41,2 \pm 1,4
15	Abastondados	0,4 \pm 0,0	1,8 \pm 1,6	2,2 \pm 1,4
16	Segmentados	23,8 \pm 6,9	20,0 \pm 7,7	30,0 \pm 9,4
17	Linfocitos	76,6 \pm 7,4	76,3 \pm 7,9	66,1 \pm 11,5
18	Monocitos	-----	2,0 \pm 1,3	1,2 \pm 0,5
19	Eosinófilos	-----	-----	0,9 \pm 0,0
20	Basófilos	-----	-----	0,4 \pm 0,0

VM \pm DE = Valor medio de las variables evaluadas \pm desviación estándar

Cuadro N° 3

Análisis de Variación multivariada para determinar la variación del perfil lipídico, enzimas, proteínas y elementos formes de la sangre en las ratas albinas bajo administración diaria, por 3 meses, vía peroral, con extracto acuoso de *P. angustifolium* R & P

Criterio de la prueba de variación multivariada

Efecto: Tratamiento

Estadística	Valor	F Aprox	Num DF	Den DF	Pr > F
Wilks' Lambda	0,00000001		26	18	0,0001
Pillai's Trace	2,00000000	9,208E10	26	20	0,0001

Fuente	Suma de		Cuadrados		
De Variación	DF	Cuadros	Medios	F Value	Pr > F
EFECTO: Del Tto sobre los valores séricos y elementos de la sangre.					
Proteína	2	1,19	0,60	3,05	0,0689
Albúmina	2	0,43	0,22	4,44	0,0246*
Globulinas	2	1,16	0,58	3,67	0,0431*
Colesterol	2	3821,86	1910,93	8,89	0,0016*
Creatinina	2	0,64	0,32	10,19	0,0008*
Urea	2	1453,36	726,69	9,14	0,0014*
Triglicéricos	2	1421,41	710,71	5,03	0,0164*
Lípidos	2	8535,70	4267,85	1,59	0,2276
Fosfatasa Alcalin	2	7,02	3,51	12,51	0,0003*
GOT	2	316,33	158,17	1,78	0,1924
GPT	2	2197,00	1098,50	5,93	0,0091*
Velocidad Sed	2	5,25	2,63	5,88	0,0094*
Hemoglobina	2	8,74	4,38	10,19	0,0008*
Hematocrito	2	95,25	47,63	21,11	0,0001*
Abastondados	2	15,08	7,54	4,82	0,0190*
Segmentados	2	525,00	262,50	4,04	0,0328*
Linfocitos	2	729,08	364,67	4,35	0,0262*
Monocitos	2	16,33	8,17	12,70	0,0002*
Eosinófilos	2	5,33	2,67	99999,99	0,0001*
Basófilos	2	1,33	0,67	7,00	0,0047*

En el cuadro se observa los resultados obtenidos y los cuales han sido analizados estadísticamente por el procedimiento MANOVA, presentó un de Lambda de Wilks pequeño y la F, indican que las variables, por el tratamiento con extracto acuoso de las hojas de *Piper angustifolium* R & P, presentaron diferencias significativas de 5%

Cuadro N° 4

Valores medios en gramos (VM) ± Desviación estándar (DE), de actividad cicatrizante, obtenidos al inducir lesiones en el lomo del ratón (n=8)

N°	Tratamiento	Grs para abrir la piel cicatrizada (VM ± DE)	Eficacia de Cicatrización (%)
1	Control	17,0 ± 0,2	7,2
2	Acuoso 50	45,8 ± 10,6	19,5
3	Acuoso 100	49,4 ± 4,4	21,0
4	Acuoso 150	42,6 ± 8,8	18,1
5	Acuoso 200	30,1 ± 2,8	12,8
6	Acuoso 250	32,5 ± 2,2	13,8
7	Alcohol 50	44,6 ± 9,3	19,0
8	Alcohol 100	47,4 ± 12,4	20,2
9	Alcohol 150	50,4 ± 5,8	21,5
10	Alcohol 200	45,8 ± 7,4	19,5
11	Alcohol 250	49,1 ± 6,9	20,9
12	Cicatrín polvo	43,3 ± 3,4	18,4
13	Acuoso tópico	59,6 ± 9,2	25,4
14	Alcohol tópico	71,0 ± 14,4	30,2
15	Piel sana	235,0 ± 12,6	100

Eficacia de cicatrización (%) = [(Gramos para abrir piel cicatrizada)/Gramos para abrir piel sana] x 100. Significancia, Análisis de varianza, F = 32,136 (p = 0,00001). El extracto alcohólico, utilizó mayor fuerza de tensión en gramos para abrir la herida cicatrizada, después de tres días de tratamiento.

CUADRO N° 5

Valores medios (VM) \pm Desviación estándar (DE), obtenidos al inducir úlcera gástrica con indometacina en animales de experimentación (n=8).

N°	TTO	DOSIS Mg/kg	Úlceras < de 1 mm	Úlceras 1-2 mm	Úlceras > 2 mm	IU	%IU
1	C. Ratas	0	14,3 \pm 0,8	11,8 \pm 1,6	10,4 \pm 1,1	36,5	0
2	Bismuto	1,5 ml	4,5 \pm 1,2	7,5 \pm 5,8	0,8 \pm 0,1	12,8	64,9
3	Microni- zado	50	4,5 \pm 2,6	4,4 \pm 1,3	1,9 \pm 1,1	10,6	70,9
		250	5,3 \pm 3,1	2,8 \pm 2,7	2,5 \pm 1,1		
4	Acuoso	50	8,4 \pm 2,3	5,6 \pm 3,0	3,9 \pm 2,0	20,4	44,1
	Acuoso	250	6,1 \pm 2,2	7,4 \pm 3,4	9,5 \pm 1,9		
5	Alcohol	50	3,5 \pm 2,6	4,0 \pm 1,4	2,0 \pm 1,0	8,9	75,6
	Alcohol	250	3,8 \pm 1,2	3,5 \pm 2,1	1,0 \pm 1,0		
6	A	200	4,6 \pm 1,7	6,6 \pm 3,9	1,3 \pm 1,1	12,5	65,8
7	B	200	4,9 \pm 0,9	2,3 \pm 1,1	-----	7,2	80,3
8	C	200	2,6 \pm 2,2	5,3 \pm 3,1	4,5 \pm 2,7	12,4	66,0
9	D	200	4,1 \pm 2,2	5,0 \pm 1,1	-----	9,1	75,1
10	E	200	11,5 \pm 4,4	1,9 \pm 2,3	-----	13,4	63,3
11	F	200	8,6 \pm 2,3	5,5 \pm 1,7	-----	14,1	61,4
12	G	200	5,2 \pm 2,1	3,1 \pm 1,7	-----	8,3	77,3
13	H	100	4,3 \pm 1,3	-----	-----	4,3	83,1
14	C. Ratón	0	12,4 \pm 2,7	-----	-----	12,4	0
15	Bismuto Ratón	1,5 ml	5,1 \pm 1,7	-----	-----	5,1	58,9

IU = índice ulceroso %IU = porcentaje de inhibición del IU

IU = [(Sumatoria del número total de úlceras de cada integrante de n) / n]

%IU = [(IU control - IU problema) / IU control] X 100

C.ratas = control ratas

C.ratón = control ratones

Cuadro N° 6

Calificación del grado de úlcera gástrica inducida en ratas y ratones que recibieron tratamiento con hojas de *P. angustifolium* R y P, teniendo en cuenta el índice ulceroso.

N°	TTO	IU	%IU	APARIENCIA DE LA MUCOSA	GRADO
1	Control Ratas	36,5	0	Edema, congestión y sangrado (Intenso)	Intenso
2	Bismuto	12,8	64,9	Edema, congestión (moderado)	Moderado
3	Micronizad	10,6	70,9	Edema, congestión moderado)	Moderado
4	Acuoso	20,4	44,1	Edema, congestión y sangrado (Moderado)	Severo
5	Alcohol	8,9	75,6	Edema, congestión (Leve)	Leve
6	A	12,5	65,8	Edema, congestión (Moderado)	Severo
7	B	7,2	80,3	Edema, congestión (leve)	Leve
8	C	12,4	66,0	Edema, congestión (Moderado)	Moderado
9	D	9,1	75,1	Edema, congestión (Leve)	Moderado
10	E	13,4	63,3	Edema, congestión (Moderado)	Leve
11	F	14,1	61,4	Edema, congestión (Leve)	Moderado
12	G	8,3	77,3	Edema, congestión (Moderado)	Leve
13	Control ratones	12,4	0	Edema, congestión y sangrado (Intenso)	Intenso
14	Bis. Ratón	5,1	58,9	Edema, congestión (leve)	Moderado
15	H (ratón)	4,3	83,1	Edema, congestión (Moderado)	Moderado

Por el cuadro, se aprecia que las lesiones gástricas fueron de leve a moderado para los animales bajo tratamiento con las diferentes formas de preparación de las hojas de *Piper angustifolium*, en tanto que lo fue en grado intenso para el control.

Cuadro N° 7

Valores medios (VM)± Desviación estándar DE, de actividad antisecretoria por el procedimiento de píloro ligado, en ratas (n=8).

N°	TTO	DOSIS Mg/kg	Vol.secreción gástrica (ml)	Milliequivalentes de iones hidrógeno/lt	% de inhibición de la secreción
1	C. Ratas	0	7,1±2,5	104,4±33,4	0
2	Ranitidin	10	1,0±0,7	5,6±1,6	85,9
3	Microniz	200	3,5±1,5	42,8 ± 13,3	50,7
4	Acuoso	200	4,5±2,1	53,3± 18,4	36,6
5	Alcohol	200	3,3 ± 1,6	43,1 ± 11,4	53,5

VSG = volumen secreción gástrico . %IVSG = porcentaje de inhibición de VSGm
 VSGm = [(Sumatoria de los VSG de cada integrante de n) / n] = valor medio VSG
 %IVSG = {[VSGm control - VSGm problema] / VSGm control} X 100]

Cuadro N° 8

Análisis de correlación y de variación, de los datos obtenidos al dosar proteínas de la secreción gástrica.

=====

Coeficiente de correlación

	ALBUMINA	GLOBULIN	PROTEINA
ALBUMINA	1,0000	0,8525	0,8808
GLOBULIN	0,8525	1,0000	0,9980
PROTEINA	0,8808	0,9980	1,0000

=====

Análisis de variancia, para determinar el nivel de significación

Fuente de Variación	SS	DF	MS	F	Sig of F
WITHIN+RESIDUAL	1,48	14	0,11		
(Model)	1,90	1	1,90	18,05	0,001
(Total)	3,38	15	0,23		

=====

La concentración de proteínas en el jugo gástrico, sufrió variación significativa, al administrar extracto alcohólico de las hojas de *Piper angustifolium*, al compararlo con el grupo control.

Cuadro N° 9

Valores medios (VM)± Desviación estándar DE, obtenidos al inducir úlcera gástrica por estres (Método de Bonfils) en ratas (n=8).

N°	Tratamiento	DOSIS Mg/kg	Úlceras < 1 mm	Úlceras 1-2 mm	Úlceras > 2 mm	IU	%IIU
1	Control	0	13,3±1,2	12,2±3,1	6,5± 0,5	31,8	0
2	Acuoso	200	4,0± 1,7	4,8±1,9	4,8± 1,6	13,6	57,2
3	Alcohol	200	4,4 ± 1,1	2,9±0,9	0,3 ±0,1	7,6	75,9

IU = índice ulceroso %IIU = porcentaje de inhibición del IU

IU = {(Sumatoria del número total de úlceras de cada integrante de n) / n}

%IIU = {[(IU control - IU problema) / IU control] X 100}

Cuadro N° 10

Análisis de varianza del tiempo sobre el índice de irritabilidad del extracto acuoso de la hojas de *Piper angustifolium* R & P, en el antebrazo de personas normales (IIPN)

Fuente de Variación	SS	DF	MS	F	Sig de F
Efecto: Tiempo de IIPN					
Tratamiento	7497,70	2	3748,85	1220,01	0,0001
Residual	175,15	57	3,07		
Total	7672,85	59	130,05		

Existe diferencia significativa al reducir la irritación inducida en el antebrazo de las personas, al ser tratadas con el extracto acuoso de las hojas de *Piper angustifolium*, esto es concentración dependiente.

Cuadro N° 11

Análisis estadístico de los datos obtenidos de los pacientes con enfermedad ulcerosa péptica y bajo tratamiento con el micronizado de las hojas de *Piper angustifolium* (dos cápsulas de 250 mg cada seis horas durante un mes)

Variables	Mean	t-value	2-tail Sig
Dolor Epigástrico:	-1,6250	-8,88	0,001
Dolor con ritmo:	-1,6250	-8,88	0,001
Periodicidad:	-1,6250	-6,18	0,001
Dispepsia:	-2,0000	-10,58	0,001
Pirosis:	-2,2500	-13,75	0,001
Náuseas:	-1,3750	-7,51	0,001
Sialorrea:	-1,3750	-7,51	0,001
Llenura:	-1,8750	-8,28	0,001

Test t para muestras pareadas

DISCUSION

En la presente investigación, se ha comprobado que las hojas de *Piper angustifolium* R. & P. bajo las formas de polvo micronizado, extracto acuoso, extracto alcohólico y sus fracciones, han mostrado eficacia farmacológica como antiulcerosas al inhibir las lesiones ulcerogénicas inducidas por indometacina, entre otros efectos estudiados.

Los estudios de toxicidad aguda demostraron que la dosis letal 50 (DL50), se hallaría sobre los 15 000 mg/kg, para el extracto acuoso y el micronizado de las hojas de *P. angustifolium* R. & P. administrado por vía peroral. Al evaluar esos hallazgos, según el criterio de Williams (3), se desprende que las sustancias ensayadas serían aparentemente inocuas. El extracto alcohólico mostró una DL50 de 2 366 mg/kg, los animales mueren posiblemente por exceso de aceites esenciales, o de alcaloides tipo pirrolizidina, estos estarían relacionados con encefalopatía hepática, o pulmonar, según Zimmerman H. y col (1995), quienes demostraron que la presencia de alcaloides tóxicos, producen lesión hepática; asimismo, porque Yan C. y col (1995) dicen que los alcaloides tipo pirrolizidina inducen hepatotoxicidad y neumotoxicidad

En el Cuadro N° 1, se observa la presencia de flavona, isoflavona, quercetina (así como todos los flavonoides) estimularían la producción de prostaglandinas E2, explicando así la actividad antiulcerosa evidenciada, esto concuerda con lo expuesto por Beil W y col (1995).

Al realizar los exámenes de laboratorio clínico, después de tres meses de administración del extracto acuoso de las hojas de *Piper angustifolium* R & P, por vía peroral diaria a ratas albinas, Cuadro 2 y 3, se observa que la diferencia significativa del 5% de los diferentes valores séricos y elementos de sangre evaluados se debería a la respuesta inmunológica de las flavonas del extracto acuoso de matico, como lo explica Krol W y col (1995), quienes demostraron que las flavonas pueden modular la respuesta inmune y la inflamatoria controlando la producción de óxido nítrico.

El efecto cicatrizante obtenido en ratones, Cuadro N° 4, se debería a la acción de las flavonas, que inhiben la peroxidación enzimática y la activación de la fosfolipasa A2, resultados concordantes con los de Ballesteros J y col (1995), quienes evidenciaron que las chalconas y sus derivados flavonas, presentaban una disminución en plaquetas dependientes de las dosis, referentes a la actividad de fosfolipasa A2 y a la generación de tromboxano TXB2.

La reducción del índice ulceroso observados en los animales, que recibieron tratamiento con extracto de las hojas de *Piper angustifolium* R & P, Cuadros 5 y 6, se debería al alto efecto citoprotector del extracto alcohólico y sus fracciones, como lo sugieren Martín y col (1996), y Reyes y col (1996), quienes observaron que la fracción flavónica de *Bidens aurea*, cicatrizó las lesiones ulcerosas inducida por ácido acético al 5%, significativamente tanto micro como macroscópicamente, debido a su rol regenerativo del epitelio y a su importante capacidad de intensificar la proliferación de vasos sanguíneos, y también debido a la actividad antiulcerogénica en una fracción de flavonoides (extracto etil acetato) de *Erica andevalensis*, sobre lesiones de la mucosa gástrica, inducida en diferentes modelos experimentales (myricetin 3-O-Dgalactósida)

La reducción de la secreción ácido gástrica, con los extractos acuoso y alcohólico y el micronizado de las hojas de *Piper angustifolium* R & P, comparados con el grupo control y patrón farmacológico, Cuadro N° 7, se debería a la actividad antisecretoria ejercida por la planta, como se explica en los trabajos realizados por Brodie (1996).

La variación significativa de la concentración de proteínas, al administrarse el extracto alcohólico de la hojas de *Piper angustifolium* R & P, comparados con el grupo control, Cuadro N° 8, nos indicaría que el extracto alcohólico incrementa la producción de mucus, que daría lugar a la reducción de lesiones frente al píloro ligado, estos hallazgos coinciden con las investigaciones reportadas por Reyes y col (1996).

La significativa disminución del índice ulceroso (Cuadro N° 9), al usar el modelo de úlcera de estrés (Bonfils), tal vez se debería a la presencia de kavapyrona, la cual posee una acción sedante modulada a través del sistema Gabaérgico, como lo sugiere Jussofie A (1994), Lemos y col (1990), Goswami S y col (1997), quienes explican la generación de úlcera por estrés, y luego, como la planta conlleva a un mejoramiento de la microcirculación de la mucosa gástrica, la secreción, la motilidad gástrica, y de los mecanismos centrales y periféricos.

La reducción del índice de irritabilidad observado en piel de humanos (N° 10), se debería a la presencia de flavonoides presentes en el extracto de las hojas de *Piper angustifolium* R & P, como se sugirió anteriormente, coincidiendo con los hallazgos de Ballesteros J y col (1995).

La disminución significativa de los signos y síntomas de 12 pacientes que cursaron con enfermedad ulcerosa péptica, bajo tratamiento con dos cápsulas de 250 mg del micronizado de hojas de *Piper angustifolium* R & P durante un mes, Cuadro N° 11, se debería a la actividad citoprotectora, antisecretoría y cicatrizante, observadas en los animales de experimentación.

Por lo anterior, habiéndose demostrado la seguridad y eficacia a nivel preclínico con las hojas de *Piper angustifolium* R & P, se justifica efectuar los estudios clínicos, mediante los exámenes endoscópicos para confirmar la eficacia sobre la úlcera péptica en seres humanos, y así como también, determinar la relación con el *Helicobacter pylori*

CONCLUSIONES

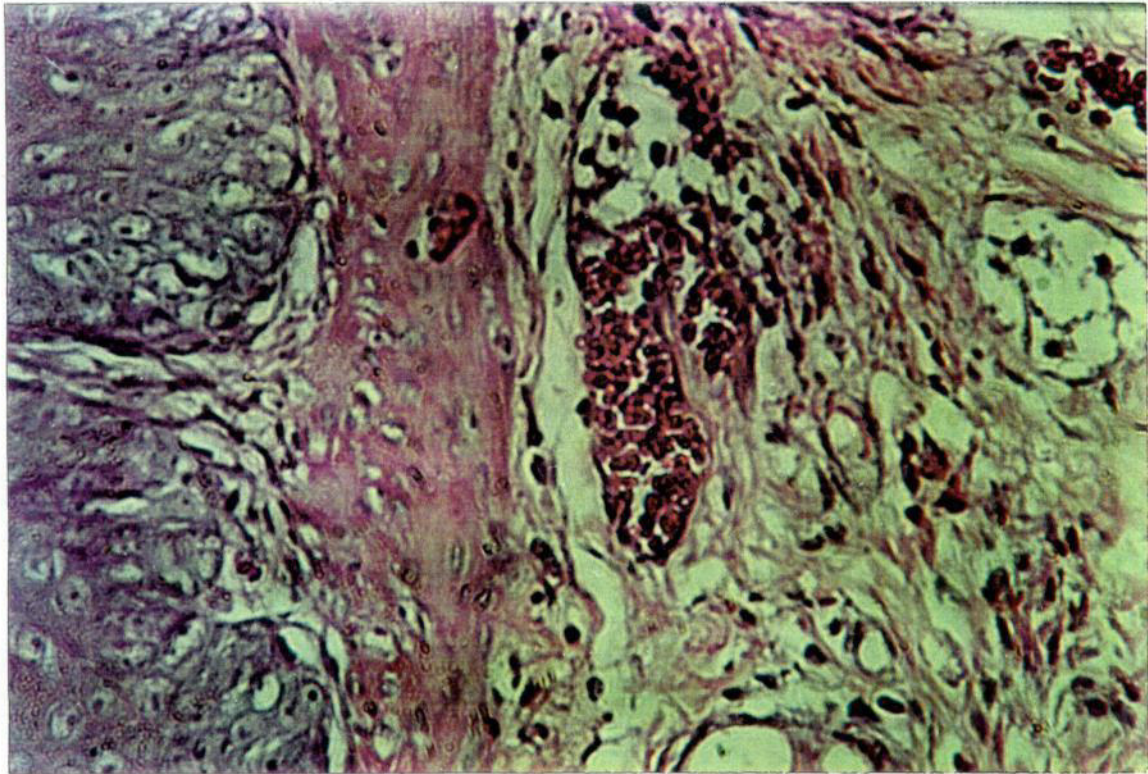
1. Se determinó mediante administración peroral la dosis letal 50 de 2 366,1 para el extracto alcohólico; mientras que estaría sobre los 15 000 mg/kg para el micronizado y el extracto acuoso.
2. El extracto acuoso no evidenció efectos tóxicos, al ser administrado en dosis de 50 mg/kg, por vía peroral durante tres meses, pero mostró una disminución del colesterol y triglicéridos en ratas albinas
3. El extracto alcohólico demostró mayor efecto cicatrizante en lesiones inducidas sobre la piel del ratón albino; así como fue más citoprotector al estudio macroscópico y microscópico, y antisecretor en las ratas albinas, al reducir el índice ulceroso y disminuir el volumen de secreción gástrica y el número de miliequivalentes de iones hidrógeno y por aumentar la concentración de proteínas.
4. El extracto acuoso disminuyó el índice de irritabilidad en humanos, siendo concentración dependiente; y el micronizado, en cápsulas mostró una mejoría de los síntomas característicos del cuadro clínico de la enfermedad ulcerosa péptica.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

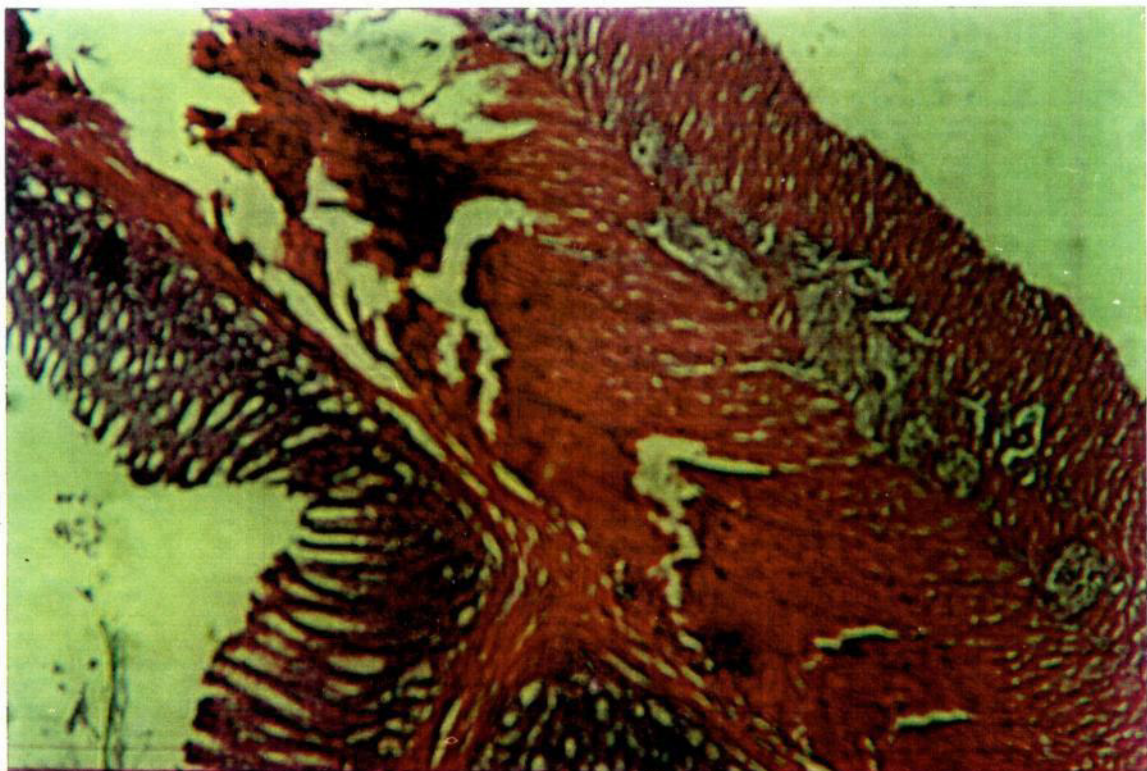
1. Achenbach H, Calle A.J, Maussa D.D, Poveda C.N. Phytochemical study on *Piper aduncan* L. Rev. Mex. Cien. Farm. 14(1):2-3, 1984
2. Aguwa C.C., Lawal AM, Pharmacologic studies on the active principles of *Calliandra portoticensis* leaf extracts. J-Ethnopharmacol. Jan; 22(1):63-71, 1994
3. Alarcon de-la-Lastra C, López A, Motilva V, Gastroprotection and prostaglandin E2 generation in rats by flavonoids of *Dittrichia viscosa*. Planta-Med. Dec; 59(6): 497-501, 1993
4. Alarcon-de-la-Lastra C, Martín MJ, La-Casa C Motila, Antiulcerogenicity of the flavonoid fraction from *Bidens aurea*: comparison with ranitidine and omeprazole. J-Ethnopharmacol. May; 42(3): 161-8, 1994
5. Arakawa T, Nakamura A, Yamada H, Nebiki H, Satoh H, Fukuda T, Kobayashi K, Protection of gastric surface epithelial cells of rats by 16,16-dimethyl prostaglandin E2 and sofalcone, a synthetic flavonoid derivative of sophoradin, against ethanol. Digestion; 41(2): 61-7, 1988
6. Ballesteros JF, Sanz MJ, Ubeda A, Miranda MA, Iborra S, Paya M, Alcaraz MJ, Synthesis and pharmacological evaluation of 2'-hydroxychalcones and flavones as inhibitors of inflammatory mediators generation. J-Med-Chem. Jul 7; 38(14): 2794-7, 1995
7. Beil W, Birkholz C, Sewing KF, Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and H. pylori growth. Arzneimittelforschung. Jun; 45(6): 697-700, 1995
8. Bellanti J.A., Kadlec J.V., Escobar G.A., Cytokinaes and the immune response. Pediatr. Clin. North Am., 41:597-621, 1994
9. Burgos MJ, Gibaja O.S "The essential oil of *Piper aduncun* L. (Matico hembra). Bol.Sci.Quím.Perú, 53(4):228-232, 1987
10. Brako L, Zarucchi JL. Catalogue of the flowering plants and Gymnosperms of Perú. Missouri Botanical Garden, Vol. 45, 901-2, 1993
11. Brodie, D.A. The mechanism of gastric hyperacidity produced by pyloric ligation in the rat. Am. J. Dig. Dis. 111: 231-241, 1992
12. Cashin, S. H., Dawson W., Kitchen E. A., The pharmacology of benoxaprofen (2-(4-chlorophenyl)-alfa-methyl)-5-benzoxazole acetic acid), LRCL 3794, a new compound with anti-inflammatory activity apparently unrelated of prostaglandin synthesis. J. Pharm. Pharmacol. 29: 330-336, 1987

- 13 De Cecil Tratado de Medicina Interna. Decimoséptima edición , Editorial Interamericana México D.F.Tomo 2, pag. 1799-1810, 1993
- 14 Devita V. Principles & Practice of Oncology, Fourth edition. Philadelphia, p 418-439, 1993
- 15 Díaz D y col. Essential oil of *Piper aduncan* L.. Rev.Latinoam Quím, 15.(3-4): 136-138, 1984
- 16 Dreyffus G, Botánica sistemática: Separata Universidad Nacional Agraria La Molina, 1990
- 17 Espejo y col, Ulcera péptica. IPSS. 1993
- 18 Goswami S., Jain S., Santani D., Antiulcer activity of cromakalim (BRL 34915), a potassium channel opener, against experimentally induced gastric and duodenal ulcers in rats and guinea pigs. J. Pharm. Pharmacol, 49: 1995-199, 1997
- 19 Goodman y Gilman, Las bases farmacológicas de la Terapéutica. Editorial McGraw Hill Interamericana, 9ª Edición, pag 1371-1387, 1996.
- 20 Jussofie A, Schmiz A, Hiemke C, Kavapyrone enriched extract from *Piper methysticum* as modulator of the GABA binding site in different regions rat brain. Psychopharmacology-Berl.Dec;116(4):469-74, 1994
- 21 Krol W., Czuba Z.P., Threadgill M.D., Cunningham B.D., Pietsz G., Inhibition of nitric oxide (NO.) production in murine macrophages by flavones. Biochem-Pharmacol. Sep 28; 50(7): 1031-5, 1995
- 22 Kroemer G., Moreno de A. Y., Gonzalo J.A., Martínez C., Immunoregulation by cytokines. Crit. rev Inmunol., 13:163-191, 1993
- 23 Lemos T.L.G., Matos F.L.A., Alencar J.W., Craverio A.A., Clark A.M., Antimicrobial activity of essential oil Brazilian plants. Phytother. Res. 4(2) 82-84, 1990
- 24 Lipkin M., Progress report: in defense of the gastric mucosa Gut. 12, pg.599-503, 1971
- 25 Lock de Ugaz, O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. Lima, Fondo Editorial Pontificia universidad Católica del Perú, p 1-7, 1988
- 26 Long J.F.et al, Gastric Antisecretory and 15cytoprotective activities The J of Pharm, & Exp.Therap.Vol 226 SCH28080 Nro.1, p.114-119, 1983
- 27 MacBride J.F., Flora of Perú. Ed. Publ. Field Museum Natural History Bot. Tom II 1937

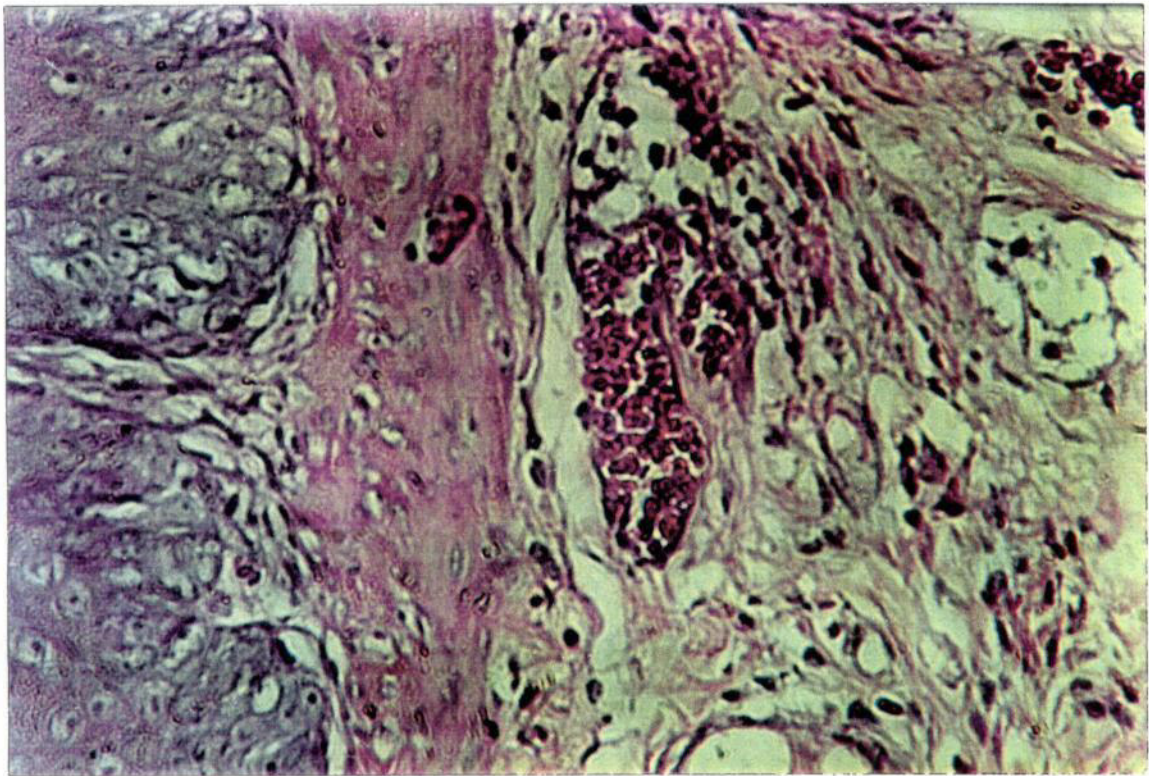
- 28 Martin C.M., La-Casa C., Motilva V., López A., Alarcon de la Lastra C., Healing process induced by a flavonic fraction of *Bidens aurea* on chronic gastric lesion in rat. Role of angiogenesis and neutrophil inhibition. *Z-Naturforsch-C*. Jul-Aug; 51(7-8): 570-7, 1996
- 29 O'Brien P, et al Evaluation Cytoprotective proprieties of antiulcer drug using quantitative histological techniques. *Dig. Dis. and Scien*, Vol 35, Nro 9 Sept. pp 1130-1139, 1990
- 30 Orjala A.J., Wright A.D., Behrends H., Folkers G., Sticher O., Ruegger H., Rali T. Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from *Piper aduncum*. *J-Nat-Prod*. Jan; 57(1): 18-26, 1994
- 31 Orjala J., Erdelmeier C.A., Wright A.D., Rali T., Sticher O., Five new prenylated p-hydroxybenzoic acid derivatives with antimicrobial and molluscicidal activity from *Piper aduncum* leaves. *Planta-Med*. Dec; 59(6): 546-51, 1993
- 32 Palacios V. J., Plantas Medicinales Nativas del Perú. CONCYTEC, pág 22-25, 1993
- 33 Reyes M., Martin C., Alarcon de La Lastra-C., Trujillo J., Toro M.V., Ayuso M.J., Antiulcerogenicity of the flavonoid fraction from *Erica andevalensis* Cabezudo-Rivera. *Z-Naturforsch-C*. Jul-Aug; 51(7-8): 563-9, 1996
- 34 Sánchez de Van O., Poma M.M., Peralta H.K., López P.M. Vegetales: alimento medicamento y belleza. Sistema de Información Científica Antonio Raimondi "SICAR" p. 68-69, 1995
- 35 Soukup S.J. Vocabulario de los nombres vulgares de la Flora Peruana. Lima, Colegio Salesiano, p 70-72, 1970
- 36 Vaisberg J.A., Milla M., Planas M., Cordova J.L., y col , Taspina is the cicatrizant principle in sangre de grado extracted from *Croton lechleri*. *Planta Médica* 55: 140-143, 1989.
- 37 Williams P., Burson J.; Industrial Toxicology Safety and Health Applications in the Work Place. De. Van Nostrand Rein Hold Company N. York , p 45-49, 1985
- 38 Yan C.C., Huxtable R.J., The effect of the pyrrolizidine alkaloids, monocrotaline and trichodesmine, on tissue pyrrole binding and glutathione metabolism in the rat. *Toxicon*. May, 1995
- 39 Zimmerman H.J.; Lewis J.H., Chemical- and toxin-induced hepatotoxicity. *Gastroenterol-Clin-North-Am*. Dec; 24(4): 1027-45, 1995
- 40 Kerlinger F. Investigación del Comportamiento, Edit. Interamericana, Segunda edición, pág. 348, 1987



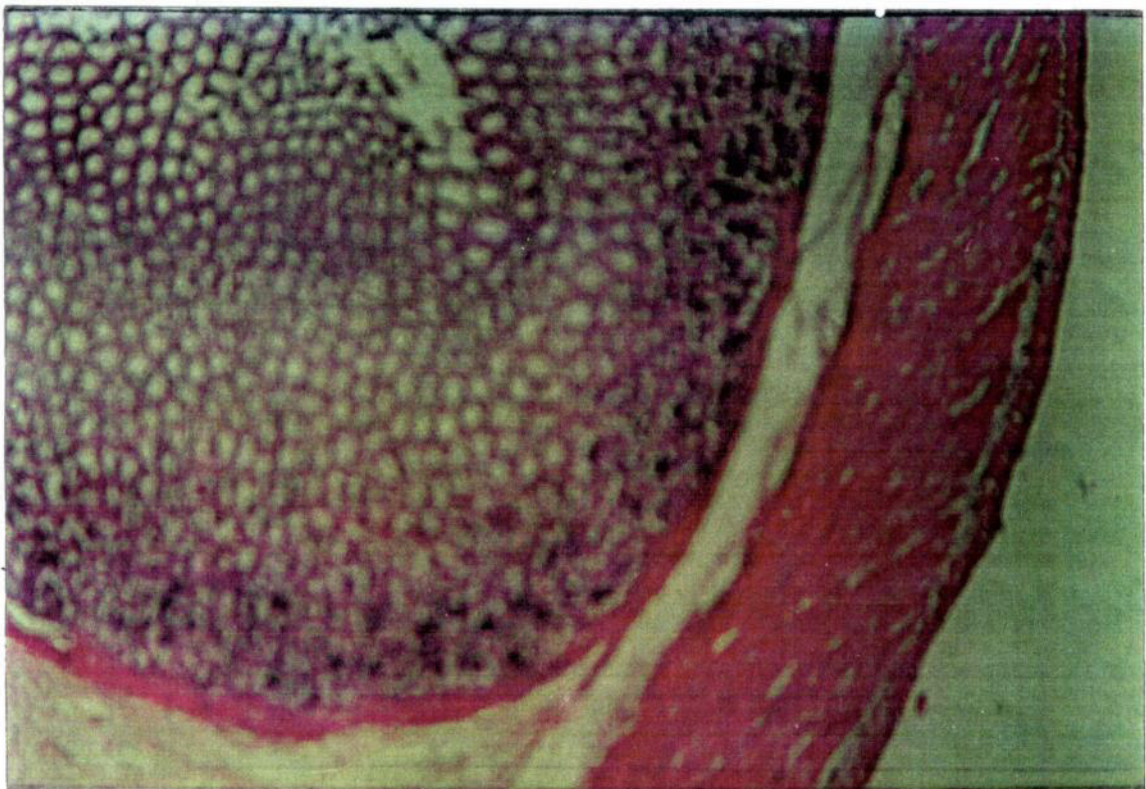
Fotografía Nro 05: Mucosa gástrica de rata albina normal



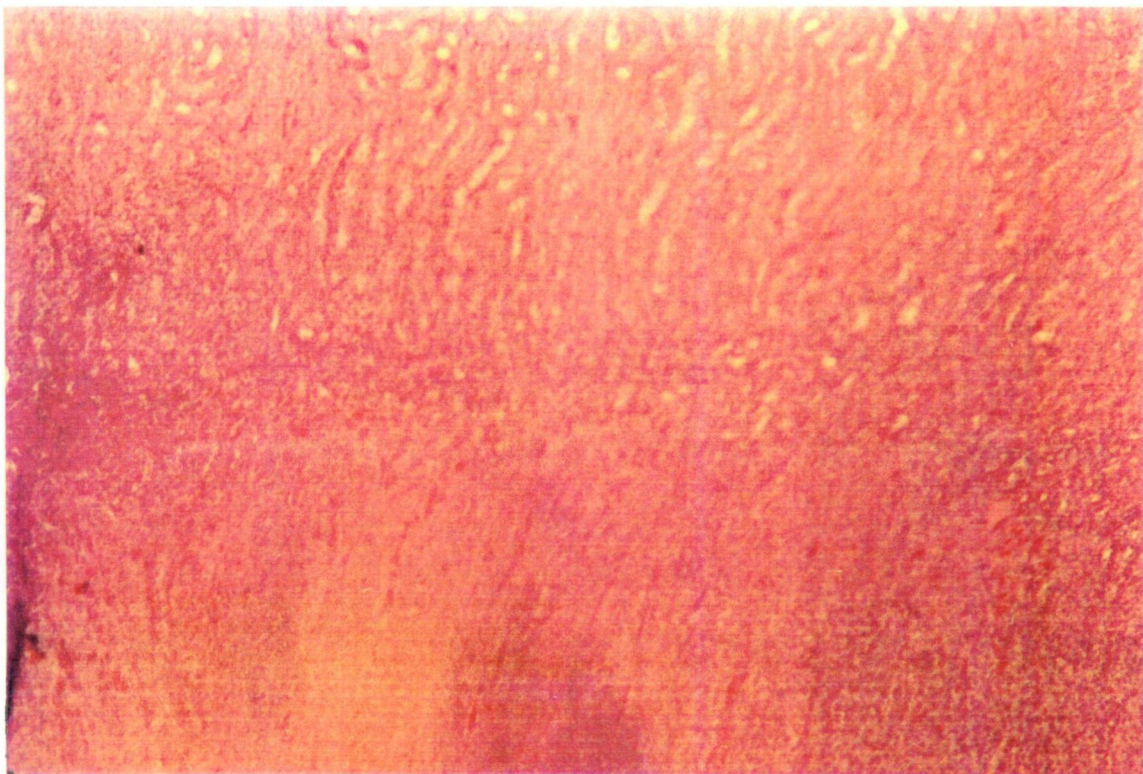
Fotografía No 06: Mucosa gástrica de rata albina, con zonas hemorrágicas, por inducción de úlcera



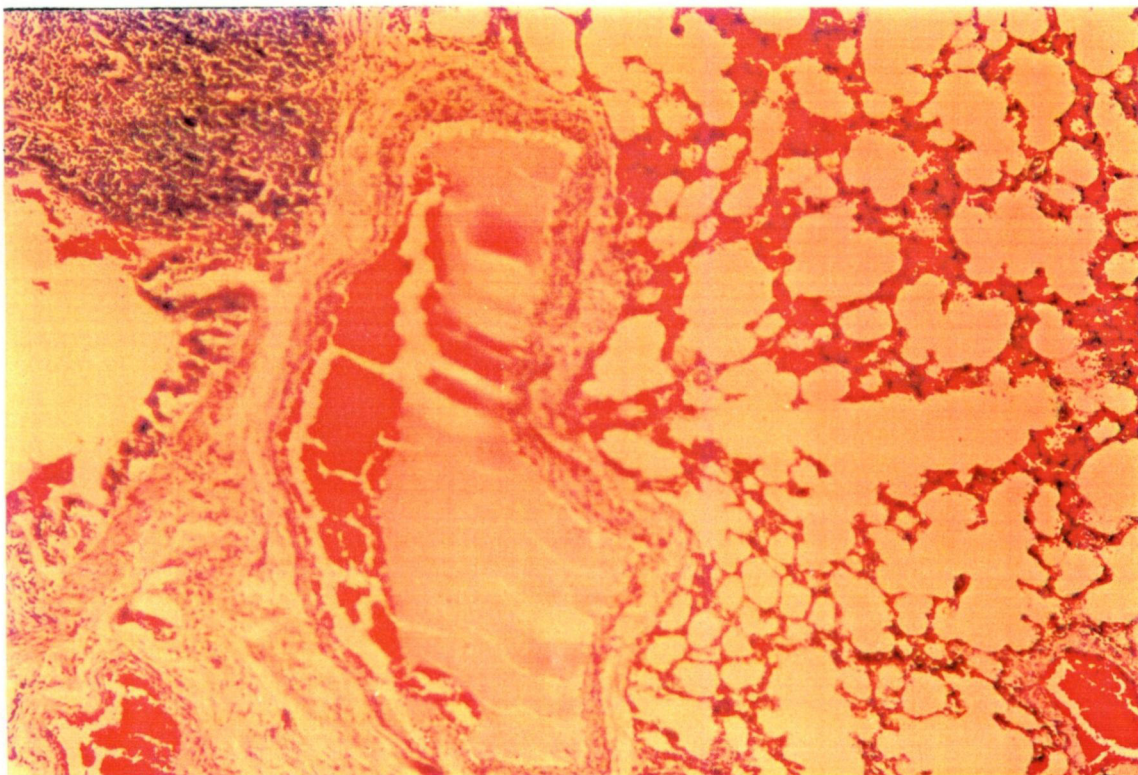
Fotografía Nro 07: Mucosa gástrica de rata albina normal



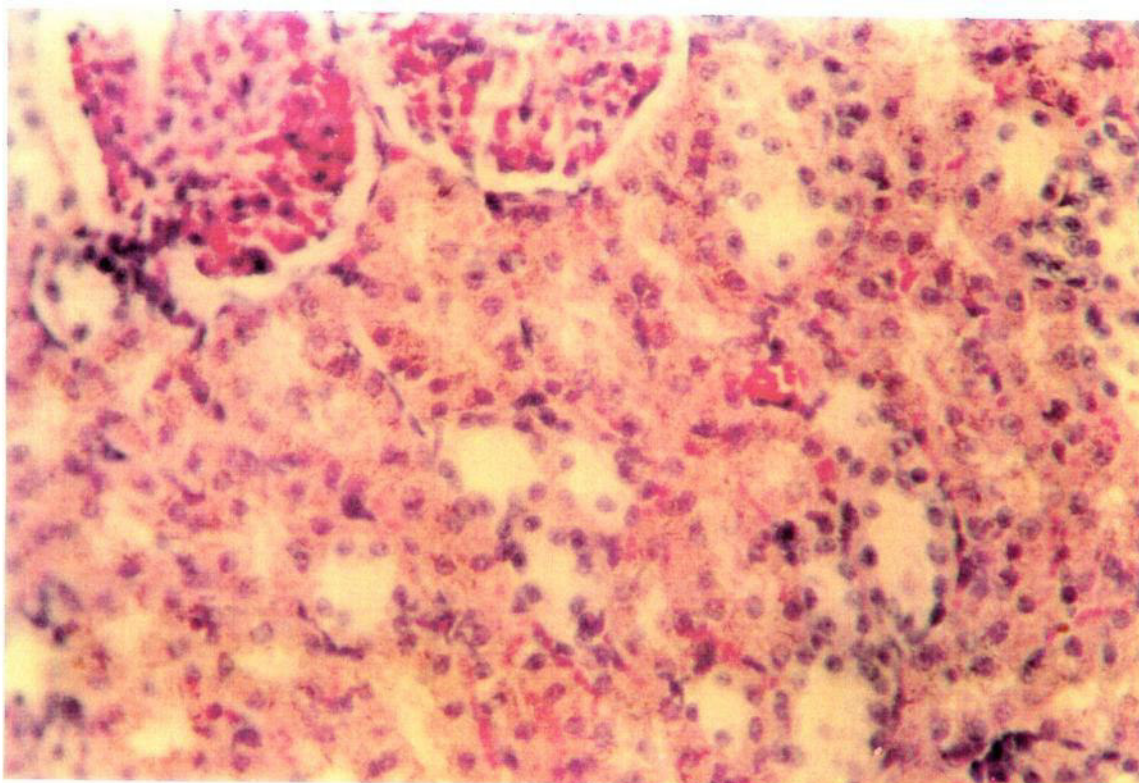
Fotografía No 08: Mucosa gástrica de rata albina, en recuperación por tratamiento con *P. Angustifolium* R & P, después de inducción de úlcera



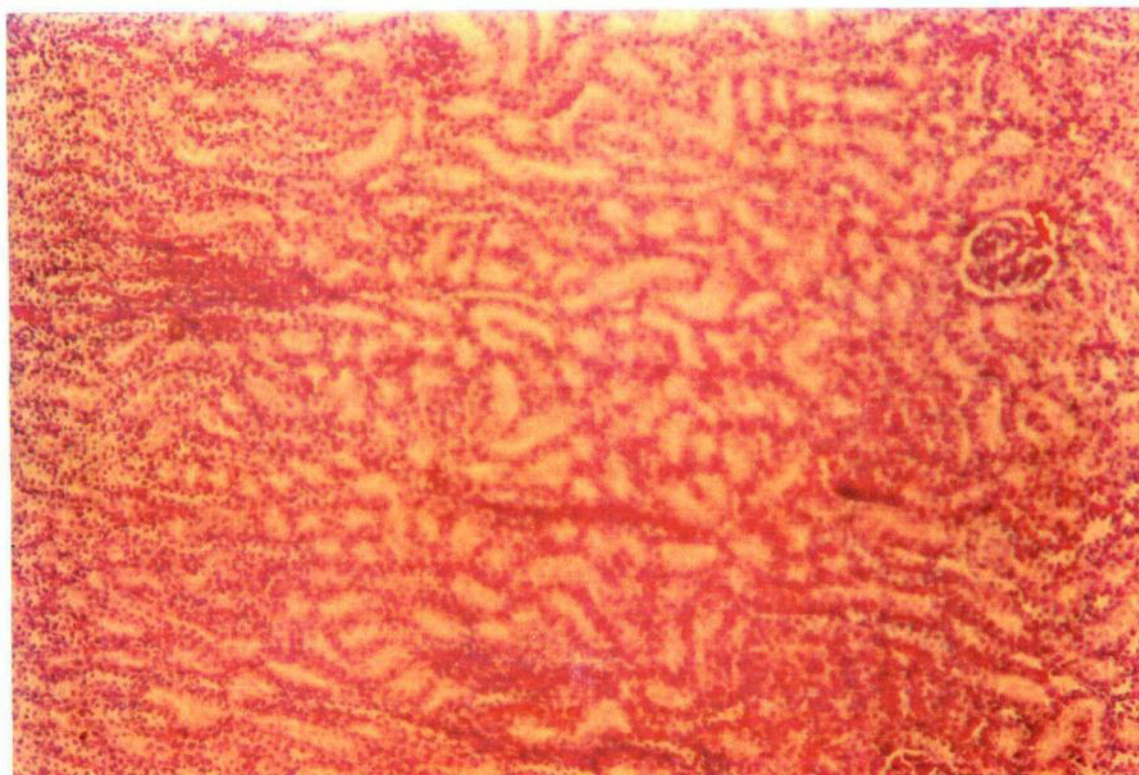
Fotografía Nro 09: Estudio histológico de pulmón después de la administración de tres meses con *P. Angustifolium* R & P, por vía peroral



Fotografía No 10: Estudio histológico de pulmón después de la administración de tres meses con *P. Angustifolium* R & P, por vía peroral



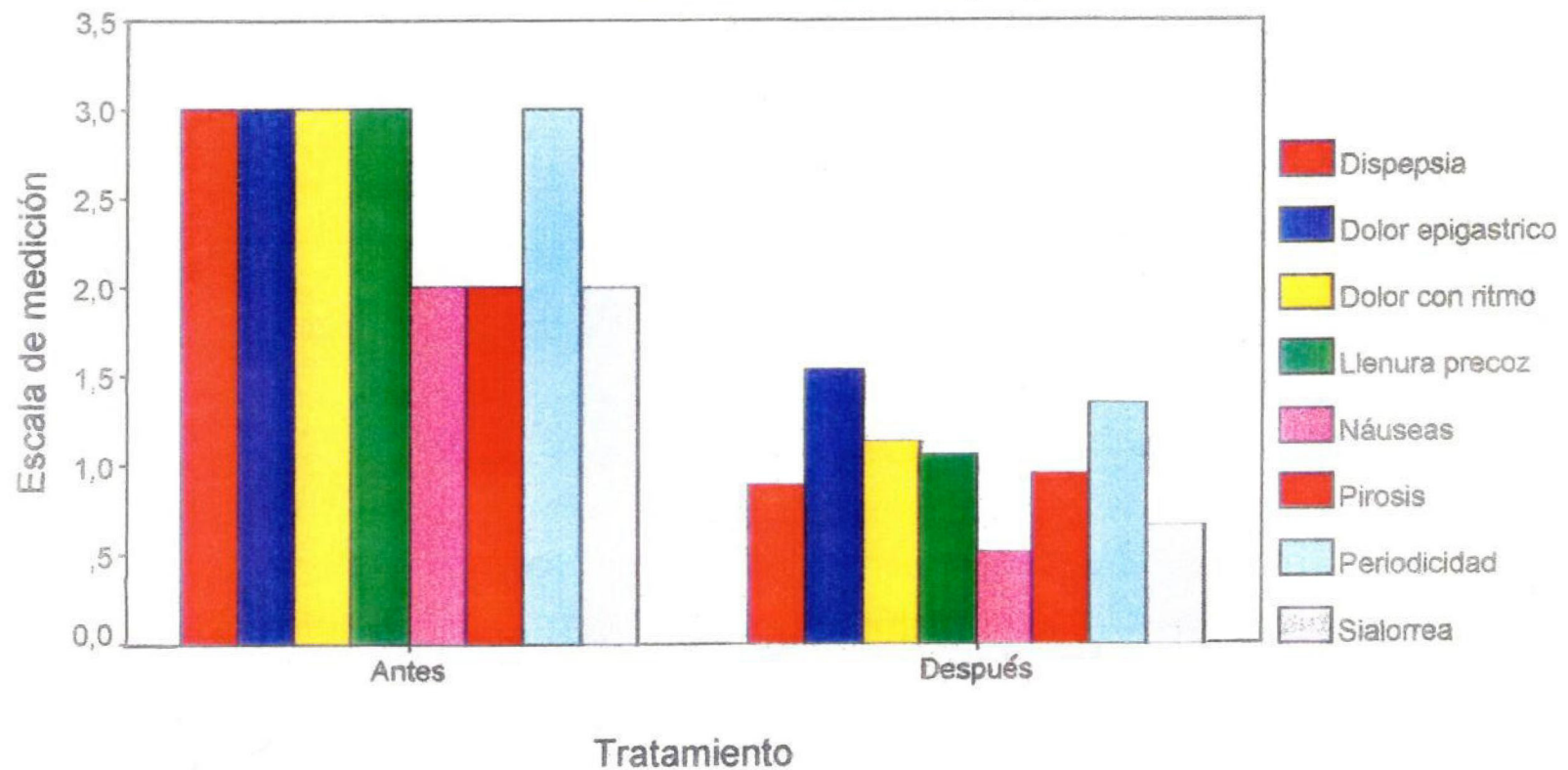
Fotografía Nro 11: Estudio histológico de riñón después de la administración de tres meses con *P. Angustifolium* R & P, por vía peroral



Fotografía No 12: Estudio histológico de riñón después de la administración de tres meses con *P. Angustifolium* R & P, por vía peroral

Gráfico N° 01

Hojas micronizadas de Piper angustifolium
Sobre la enfermedad ulceroso péptica





COMO AYER, AHORA Y EN EL FUTURO
SE SEGUIRA BUSCANDO NUEVOS RECURSOS
TERAPEUTICOS PARA EL TRATAMIENTO DE
LAS ENFERMEDADES DEL APARATO DIGESTIVO